

UNIVERSITÀ di PISA

SCUOLA di DOTTORATO in BIOLOGIA

Tesi di Dottorato

Ciclo del Dottorato XXII

EFFETTI DELLA LUCE SULLA RESPIRAZIONE CELLULARE: RUOLO DELLA CITOCROMO *c* OSSIDASI

Candidato: Alessandro Remedi

Tutors: Prof. Graziano di Giuseppe
Dr Giovanni Cercignani

RIASSUNTO

In letteratura sono descritti alcuni effetti sul metabolismo e sulla vitalità cellulare dovuti a irraggiamento con luce rossa o vicino-infrarosso (NIR) (Karu, 1999; Koutna et al., 2003; Vladimirov et al., 2004; Wan-Ping Hu et al., 2007, Eells et al. 2003; Whelan et al., 2003, Karu et al. 2005). La luce blu intorno a 420 nm e la luce rossa inducono inoltre, in mitocondri isolati, un incremento nella fosforilazione degli adenilati e nel consumo di O₂ durante l'irraggiamento (Kato et al., 1981; Veshkin, 1991). Anche se non ci sono risultati inconfutabili, è stato suggerito che la citocromo *c* ossidasi (CcOX) sia il possibile fotoaccettore primario alla base di questi fenomeni.

Nella prima fase del mio progetto di dottorato ho sviluppato la mia ricerca con l'intento di chiarire il probabile ruolo di fotoaccettore *in vivo* della CcOX, ed eventualmente comprenderne il meccanismo. Successivamente ho cercato di chiarire il ruolo biologico di una modulazione della cinetica della respirazione da parte della luce. A tale scopo, ho scelto come modelli sperimentali il ciliato *Tetrahymena thermophila* che vive in ambienti esposti alla luce solare ed è dotato di un numero elevato di mitocondri. Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* che è in grado a seconda dell'ambiente di utilizzare oppure no la via fosforilativa.

Come sistema di misura è stato utilizzato l'elettrodo ad ossigeno tipo Clark e come parametro per l'analisi della variazione dell'attività enzimatica il rapporto tra la velocità di consumo di O₂ durante l'irraggiamento e la velocità iniziale misurata al buio.

In una prima fase ho effettuato misure *in vivo* su cellule di *T. thermophila*, e di *S. cerevisiae* cresciuto in condizioni aerobie. L'irraggiamento con luce visibile ($390 < \lambda < 700$ nm), nelle nostre condizioni sperimentali, induceva un considerevole incremento nella velocità di consumo di O₂ di queste cellule. Tale aumento di velocità di respirazione era funzione della lunghezza d'onda ed era massimo per la banda spettrale del blu. ($390 < \lambda < 440$ nm). Un effetto modesto ma stabile era stato misurato anche con la luce arancio-rossa ($570 < \lambda < 700$ nm).

Le curve dose-effetto di *T. thermophila* ottenute utilizzando queste due bande spettrali, mostravano che la differenza fra le entità di attivazione con le due bande

spettrali era comparabile con quella dei due picchi principali della CcOX a valenza mista.

Inoltre, il lievito *S. cerevisiae* coltivato in condizioni di semi-anaerobiosi, in cui è dimostrata una riduzione dell'espressione di alcune subunità della CcOX, mostrava un basso livello di respirazione cellulare basale e un trascurabile incremento del consumo di ossigeno indotto dalla luce.

Questo risultato era confermato dalle risposte ottenute con cellule di *S. cerevisiae* affette da una mutazione nell'espressione della subunità VIb della CcOX, in cui non c'era alcuna risposta alla luce, che si otteneva invece nella sua specie selvatica.

L'insieme dei risultati descritti suggeriva fortemente un coinvolgimento della CcOX nell'aumento di velocità misurato durante l'irraggiamento.

Per comprendere il meccanismo alla base del fenomeno osservato sono state condotte delle misure con l'inibitore della CcOX Sodio Azide (N_3Na). L'inibitore, a parità di concentrazione, aveva meno effetto su cellule irraggiate rispetto a cellule non irraggiate. Questo è un risultato interessante anche se non permette di comprendere del tutto il meccanismo che sta alla base dell'effetto della luce.

Benché i meccanismi di base legati all'irraggiamento non siano troppo chiari, i risultati ottenuti effettuando misure a differenti fasi della crescita delle colture suggeriscono un ruolo rilevante della luce sulla fisiologia cellulare. Infatti, le curve dose-effetto misurate nelle diverse fasi di crescita delle colture di *T. thermophila* indicavano che sia la respirazione basale sia l'entità dell'aumento della respirazione in risposta all'irraggiamento luminoso erano dipendenti dalle differenti età della coltura.

L'insieme dei risultati ottenuti nel periodo di dottorato mostrano che la CcOX è coinvolta nell'aumento della respirazione cellulare e danno alcune indicazioni sul meccanismo d'azione della luce nei confronti dell'enzima, ma non consentono una spiegazione esaustiva.

Indicano un possibile ruolo della luce nella regolazione del metabolismo cellulare in natura. Poiché tutti i nostri esperimenti sono stati effettuati mantenendosi il più possibile vicini alle condizioni naturali, le indicazioni da noi ottenute suggerirebbero un coinvolgimento dello stesso ciclo solare nella regolazione della fisiologia cellulare dei microorganismi.

ABBREVIAZIONI E SIGLE USATE

CcOX	= citocromo <i>c</i> ossidasi
Cit <i>c</i>	= citocromo <i>c</i>
HEPES	= acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico
TMPD	= <i>N,N,N</i> ¹ , <i>N</i> ¹ -tetrametil- <i>p</i> -fenilendiammina
EDTA	= acido etilen-diammino-tetracetico
TTX	= tetrodotossina
ROS	= reactive oxygen species
LED	= Light Emitting Diode
LIL	= Low Intensity Laser
OMA	= Optical Multi-Array

INDICE

1. INTRODUZIONE	p. 1
1.1 Effetti fotobiologici di luce rossa e vicino-infrarosso	p. 1
1.2 Citocromo <i>c</i> ossidasi (CcOX): struttura e funzione	p. 10
1.3 Interazioni fra CcOX e nucleotidi adeninici (ATP, ADP)	p. 21
1.4 Inibitori della CcOX	p. 23
1.5 DNA barcoding e CcOX	p. 26
1.6 Modelli Biologici	p. 27
<i>Tetrahymena thermophila</i>	p. 27
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	p. 29
2. MATERIALI E METODI	p. 32
2.1 Coltivazione dei tipi cellulari utilizzati	p. 32
Coltivazione delle cellule di <i>T. thermophila</i>	p. 32
Coltivazione delle cellule di <i>S. cerevisiae</i>	p. 32
Coltivazione delle cellule di <i>S. cerevisiae</i> e mutanti	p. 33
2.2 Apparato Sperimentale	p. 34
2.2.1 Set-up per l'irraggiamento	p. 35
2.2.2 Elettrodo di Clark	p. 38
2.3 Inibitori della CcOX	p. 41
2.4 Enzima isolato: misure spettrofotometriche e ossigrafiche	p. 42
2.5 Procedura sperimentale	p. 42
2.5.1 Preparazione dei campioni cellulari	p. 42
2.5.2 Misura ossigrafica	p. 43
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	p. 45
3.1 Misure preliminari per il saggio cellulare all'elettrodo di Clark	p. 45
3.2 Misure della velocità di consumo di O ₂ durante irraggiamento con luci di diversa lunghezza d'onda.	p. 49
3.2.1 <i>Tetrahymena thermophila</i>	p. 49
3.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	p. 53
3.3 Meccanismo d'azione: misure con inibitori e con impulsi di luce ripetuti	p. 57
3.4 Curve dose-risposta in funzione dell'età della coltura	p. 63
4. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE	p. 69
RINGRAZIAMENTI	p. 70
5. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	p. 71

1. INTRODUZIONE

1.1. Effetti fotobiologici di luce rossa e vicino-infrarosso

Una reazione fotobiologica avviene quando l'assorbimento di luce di una specifica lunghezza d'onda (λ) da parte di molecole fotorecettrici modifica o modula la loro funzione.

Tali molecole fotorecettrici possono essere distinte in due classi:

- Molecole fotorecettrici specializzate (rodopsina, batteriorodopsina, clorofille, fitocromo)
- Molecole fotorecettrici non specializzate, dette fotoaccettori

Diversamente dai fotorecettori, i fotoaccettori normalmente prendono parte a reazioni metaboliche cellulari che non sono connesse con una risposta alla luce, però la loro attività può essere modulata da un'eventuale stimolazione luminosa. Quindi, un fotoaccettore è una molecola parte di strutture-chiave implicate nella regolazione di un pathway metabolico, che in seguito all'assorbimento della luce, si attiva, assumendo uno stato elettronico eccitato, e innesca dei processi molecolari primari. Questi ultimi possono a loro volta modificare la regolazione del pathway e indurre risposte metaboliche cellulari riconducibili alla stimolazione luminosa effettuata.

Lo studio di questi fenomeni è stato condotto prevalentemente con sorgenti laser, perché più pratiche per alcuni tipi di stimolazioni. I laser sono largamente utilizzati in chirurgia e, più recentemente, sono stati usati per la terapia medica. In questo caso sono noti gli effetti terapeutici, ma non sono ancora chiariti i meccanismi biochimici che ne stanno alla base. L'attivazione dei processi vitali dovuta a irraggiamento con luce laser è spesso denominata biostimolazione. In dosi elevate, l'azione positiva dell'irraggiamento laser si trasforma in una inibizione dell'attività dei processi vitali. Invece, l'irraggiamento con laser a bassa intensità (Low Intensity Laser, LIL) o LED luminosi, che stanno sostituendo i laser per questo tipo di uso, è diffusamente praticato in molte branche della medicina (Vladimirov et al, 2004).

Le bande di luce più efficaci e correntemente utilizzate nell'irraggiamento LIL terapeutico stanno nell'intervallo del visibile e vicino-infrarosso: vengono infatti utilizzati laser He-Ne (632,8 nm), Ga-Al (630-685 nm), He-Ne-As (780-870 nm), Ga-As (904 nm) e LED tra 670 e 950 nm. Sia sistemi laser che LED hanno gli stessi effetti alla stessa lunghezza d'onda, intensità, tempo di irraggiamento.

Dal punto di vista clinico gli effetti che sono stati attribuiti all'azione della luce laser sono un'azione antinfiammatoria, un'accelerazione della rigenerazione di organi danneggiati e una vasodilatazione della zona interessata. Queste azioni sono associabili all'aumento di attività di alcuni tipi cellulari come leucociti e fagociti e all'aumento della divisione cellulare, della sintesi proteica, della citochinesi, della circolazione sanguigna.

Gli studi riportati in letteratura suggeriscono che l'azione della luce visibile su cellule e tessuti animali induce, come effetto finale, la sintesi proteica e la proliferazione cellulare.

I possibili effetti dell'irraggiamento laser sui sistemi biologici sono due (Vladimirov et al, 2004):

- Azione specifica della radiazione laser (luce “concentrata”):

Ipotesi dell'ossigeno singoletto per la quale molecole assorbenti la luce, come porfirine e flavoproteine, possono essere convertite in derivati che possiedono le proprietà di fotosensibilizzatori a livello della catena respiratoria e sviluppare $^1\text{O}_2$ in risposta alla luce. $^1\text{O}_2$ potrebbe a sua volta stimolare processi biologici come la sintesi di RNA e DNA. A sostegno di questa ipotesi c'è il fatto che gli spettri di assorbimento e di azione delle cellule HeLa contengono picchi che possono essere ascritti a porfirine e flavine.

- Azione fotochimica della luce (laser, LED) nel visibile-vicino infrarosso (Karu, 1999):

Ipotesi dell'influenza della luce sui cromofori metallici (Cu e eme) di cui è dotata l'enzima mitocondriale **citocromo c ossidasi (CcOX)**; la luce influenzerebbe lo stato redox di questi centri e di conseguenza la velocità di trasferimento degli elettroni nella molecola.

Evidenze sperimentali mostrano che i mitocondri sono sensibili all'irraggiamento con luce monocromatica visibile e vicino-infrarosso. Un irraggiamento con luce alla lunghezza d'onda di 633 nm incrementa il potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi$), il gradiente protonico, la velocità di scambio ADP/ATP, così come la sintesi di RNA e proteine mitocondriali, e causa cambiamenti nelle proprietà ottiche dei mitocondri.

Si ritiene che i mitocondri siano il target primario quando intere cellule vengono irraggiate con luce a 630, 632,8 e 820 nm, in quanto rispondono al trattamento con una perturbazione della produzione di energia e del potenziale di membrana (Karu, 1999).

Questo pone un importante quesito: quale molecola mitocondriale è responsabile degli effetti sopra menzionati?

Le molecole che costituiscono le catene redox sono un buon esempio di fotoaccettori mitocondriali.

Analisi comparative degli spettri d'azione dei metalli di transizione e dei loro complessi da un lato e delle biomolecole partecipanti alla regolazione del metabolismo cellulare dall'altro (ad esempio all'induzione della proliferazione di cellule HeLa, **Fig. 1.1**), suggeriscono che potrebbero essere implicati enzimi multinucleari contenenti Cu^{2+} , e, precisamente, diversi tipi di centri contenenti Cu^{2+} che assorbono nelle bande 760-830 nm.

Queste analisi comparative suggeriscono che tutte le bande nello spettro d'azione sono relative alla CcOX, che può essere considerata un fotoaccettore in quanto le bande suddette combaciano con quelle nello spettro di assorbimento dell'enzima.

In particolare, la citocromo *c* ossidasi sembra essere un target particolare della luce monocromatica rossa e vicino-infrarosso, in quanto i picchi nei due spettri stanno tra 600 nm e 850 nm di lunghezza d'onda della luce. Questi picchi coincidono con quelli nello spettro di assorbimento dei centri rameici contenuti nell'enzima:

$\text{Cu}_{\text{A(ox)}}$: 825 nm; $\text{Cu}_{\text{A(red)}}$: 620 nm; $\text{Cu}_{\text{B(ox)}}$: 680 nm; $\text{Cu}_{\text{B(red)}}$: 760 nm.

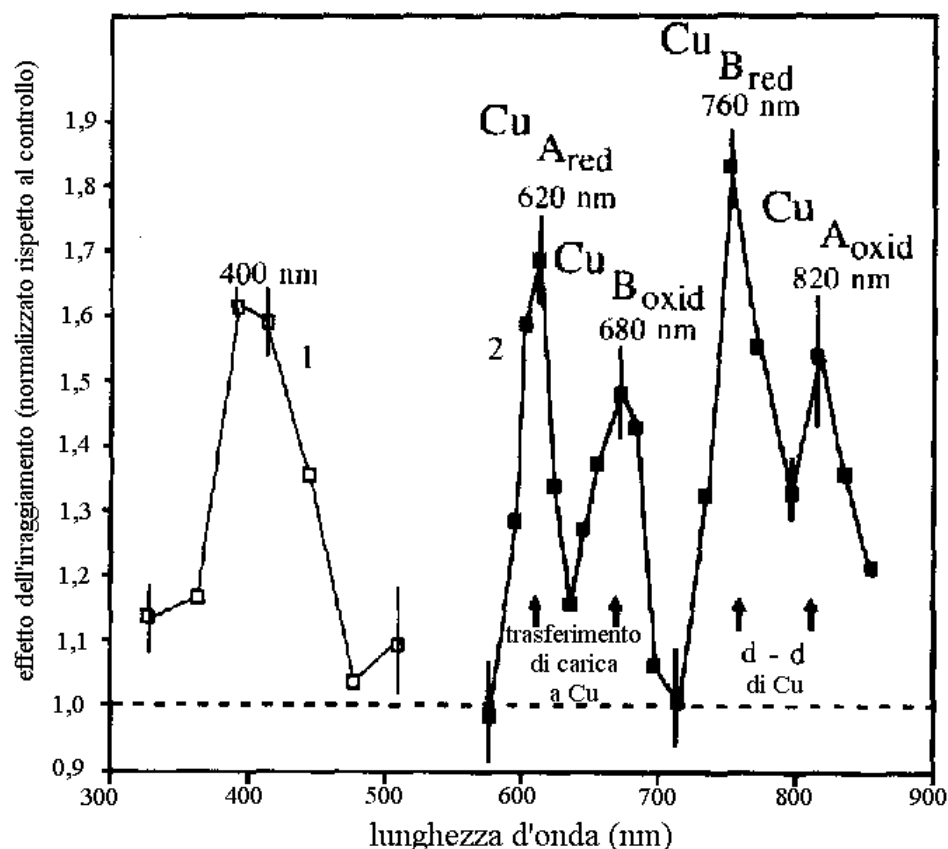


Figura 1.1: Curve Dose-Risposta dell'aumento di proliferazione delle cellule HeLa in funzione della lunghezza d'onda. In ordinata effetto dell'irraggiamento normalizzato al controllo, in ascissa la lunghezza d'onda in nm (da Karu, 1999 con modificazioni).

L'eccitazione elettronica di questi centri in differente sequenza da parte della luce può influenzare il trasferimento degli elettroni nella CcOX e questo può avere un effetto sulla risposta biologica misurata che è la sintesi del DNA.

L'analisi spettrale delle varie bande negli spettri di azione dell'enzima fanno concludere che la CcOX non può essere considerata un fotoaccettore primario quando si trova nella forma completamente ossidata o completamente ridotta, ma solo quando si trova in una forma a valenza mista (forma intermedia) non ancora ben identificata (Karu, 1999).

La fotoeccitazione sembra innescare nelle cellule irraggiate con luce visibile e vicino-infrarosso reazioni primarie (fotoaccettore direttamente coinvolto) e secondarie (dipendenti dalle primarie). Le primarie durano da secondi a minuti dopo l'irraggiamento, le secondarie avvengono ore o giorni dopo l'irraggiamento.

Tra le varie ipotesi di azione dell'irraggiamento laser sui sistemi biologici riveste sicuramente grande importanza il lavoro riportato nella rassegna di Karu (1999). Relativamente al modello che coinvolge la citocromo *c* ossidasi si possono fare ipotesi sui meccanismi primari e secondari:

Primari:

- La fotoeccitazione varia lo stato redox dei centri assorbenti e quindi il flusso di e^- che porta alla produzione di ATP. E' stato suggerito che l'irraggiamento potrebbe spostare i citocromi verso forme più ridotte che naturalmente promuovono il trasporto degli elettroni.
- Durante l'irraggiamento luminoso una frazione dell'energia di eccitazione è inevitabilmente convertita in calore. La fotoeccitazione porta quindi a conversione in calore, con effetti di aumento locale della temperatura nei cromofori, che possono variare la loro attività biochimica mediante cambiamenti conformazionali e strutturali.
- L'irraggiamento potrebbe variare l'entità di reazioni parziali di riduzione dell' O_2 (formazione dei radicali superossido e ossidrilici e di H_2O_2); alcune di queste sostanze, peraltro potenzialmente dannose per l'organismo (fanno parte del gruppo delle ROS, reactive oxygen species), potrebbero modulare lo stato redox dei centri reattivi dell'enzima, riconducendo al primo meccanismo (Karu et al, 1993).

Nel mitocondrio è stata dimostrata la presenza di anione superossido e del suo prodotto di dismutazione H_2O_2 . Dati sperimentali dimostrano che i mitocondri epatici rispondono all'UV, che genera anione superossido, variando la sintesi di ATP.

E' noto che un aumento, anche piccolo, nella concentrazione di anione superossido e di H_2O_2 in una cellula, comporta varie risposte secondarie: incremento della $[Ca^{2+}]$ intracellulare, alcalinizzazione (incremento pH_i), rilascio di acido arachidonico, attivazione dell'antiporto Na^+/H^+ , della Ca^{2+} -ATPasi, alterazione dello scambio Na^+/Ca^{2+} . Molte di queste reazioni avvengono anche in cellule irradiate sia con luce visibile che nel vicino-infrarosso.

- La molecola che assorbe potrebbe agire da fotosensibilizzante e generare $^1\text{O}_2$. Si ritiene esistano due pathways distinti di formazione di $^1\text{O}_2$: transizione del fotoaccettore dallo stato S_0 allo stato S_1 con trasferimento dell'energia all' O_2 ; eccitazione diretta dell' O_2 . Questa molecola potrebbe essere implicata nella regolazione degli effetti secondari (*dark effects*).

Secondari:

- Se il meccanismo primario produce alterazioni nello stato stazionario cellulare di parametri come $\Delta\mu_{\text{H}^+}$, $\Delta\Psi$, pH_i , $[\text{ATP}]$ (il cui incremento nella sintesi è guidato da ΔpH e $\Delta\Psi$ secondo il modello di Mitchell) ecc., questi possono indurre variazioni a lungo raggio e lunga durata in cellule e tessuti.

Molti degli effetti sui processi biochimici cellulari si sviluppano dopo ore o addirittura giorni dalle procedure di irraggiamento. Queste risposte biologiche cellulari generalmente avvengono più tardi, quando l'irraggiamento è cessato e sono dette risposte secondarie.

La specificità dell'azione della luce si ritiene essere dovuta all'assorbimento di quanti di luce dal fotoaccettore citocromo *c* ossidasi e/o da componenti flaviniche della catena di trasporto degli elettroni mitocondriale (Karu, 1999).

La fotoeccitazione induce cambiamenti nello stato redox di queste proteine che potrebbero modulare svariate vie biochimiche attraverso una trasduzione del segnale e una catena di amplificazione. La trasduzione del segnale e la catena di amplificazione, a loro volta, genererebbero effetti fotobiologici quali l'aumento della sintesi di DNA e la proliferazione cellulare.

Secondo questo modello quindi l'assorbimento di quanti di luce da parte delle componenti della catena respiratoria causa un'attivazione a breve termine della catena respiratoria e l'ossidazione del pool NADH che comporta cambiamenti nello stato redox di mitocondri e citoplasma. L'attivazione della catena di trasporto degli elettroni comporta un incremento della forza motrice protonica ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) e dell'acidificazione del citoplasma.

E' stato dimostrato sperimentalmente (Passarella et al, 1984) che l'irraggiamento dei mitocondri con laser He-Ne (ad una potenza di 15 mW e una dose energetica complessiva di 5 J/m²) comporta l'attivazione della catena respiratoria con variazioni significative in $\Delta\mu_{H^+}$, $\Delta\Psi$, pH_i , ed extrasintesi di ATP. Quest'ultima, secondo questi autori, sarebbe prodotta direttamente dall'incremento della forza protomotrice indotto dalla luce.

L'incremento della sintesi di ATP è stato visto in mitocondri irraggiati con $\lambda > 400$ nm, linfociti umani con $\lambda = 820$ nm, R3230AC (cellule di adenocarcinoma) con $\lambda = 630$ nm, cellule HeLa con $\lambda = 632,8$ nm (Karu, 1999).

L'irraggiamento di linfociti umani con laser He-Ne causa molti cambiamenti nell'ultrastruttura mitocondriale, così come la formazione di mitocondri giganti, interpretata da vari autori come un'intensificazione del metabolismo energetico.

L'acidificazione del citoplasma, causata dall'attivazione della catena di trasporto degli elettroni, controlla allostericamente l'attività dell'antiporto Na^+/H^+ situato a livello della membrana plasmatica. Questa proteina gioca un ruolo essenziale nell'alcalinizzazione del mezzo intracellulare. Un incremento a breve termine del pH intracellulare è una delle componenti necessarie coinvolte nella trasmissione dei segnali mitogenici cellulari.

L'aumento del pH intracellulare dopo l'irraggiamento è stato misurato sperimentalmente. Il pH_i è quindi da considerare un parametro fondamentale dell'omeostasi cellulare, strettamente connesso con lo stato redox cellulare, che sembra essere particolarmente perturbato dall'irraggiamento. Esso rappresenta il bilancio tra equivalenti di riduzione e di ossidazione in equilibrio dinamico ed è determinato da tre indici: i rapporti $NADH/NAD^+$, $NADPH/NADP^+$, $GSH/GSSG$ (glutathione). Questi rapporti sono mutualmente dipendenti: l'alterazione del rapporto di una coppia causa cambiamenti nell'altra e il pH_i è strettamente connesso con questi rapporti. È noto che ogni spostamento nello stato redox e nell'attività metabolica di una cellula altera necessariamente la sua radiosensibilità e la sua risposta adattativa alle radiazioni.

L'antiporto Na^+/H^+ non è la sola proteina che partecipa attivamente al segnale fototrasduttivo e nella catena di amplificazione. Altre proteine come la Na^+/K^+ -ATPasi e gli enzimi che controllano l'AMP ciclico intracellulare (cAMP) sono attivate: è stata dimostrata l'attivazione della Na^+/K^+ -ATPasi dopo irraggiamento

con laser He-Ne di eritrociti umani e la variazione dei livelli intracellulari di cAMP a varie λ .

A sostegno di quando detto cellule HeLa irradiate con luce monocromatica nel visibile-vicino infrarosso (600-860 nm) con energia di 52 J/m² aumentano la loro capacità di adesione al substrato e in questo fenomeno sembrerebbero appunto essere coinvolti i trasportatori membranali sopracitati e la citocromo *c* ossidasi (Karu et al. 2003). E' stato infatti visto che cellule pretrattate con ouabaina (inibitore della Na⁺/K⁺-ATPasi), amiloride (inibitore dell'antiporto Na⁺/H⁺) o sodio azide (inibitore della citocromo *c* ossidasi) e successivamente irradiate modificano lo spettro di azione dell'incremento di adesione al substrato.

È stato trovato anche che la [Ca²⁺] intracellulare è aumentata durante i primi minuti di irraggiamento di linfociti umani, neutrofili, spermatociti bovini e cellule di Schwann di ratto.

Sono suggeriti due pathways distinti della regolazione del metabolismo cellulare da parte della luce (Karu, 1999):

- 1) L'esistenza di una connessione tra le funzioni redox mitocondriali attivate dalla luce grazie all'eccitazione dei vari cromofori e la generazione di specie reattive dell'ossigeno, il cambiamento nello stato redox citoplasmatico, la depolarizzazione delle membrane cellulari, l'influsso di Ca²⁺ e l'incremento del pH_i.
- 2) La relazione tra fotoaccezione e il livello di ATP intracellulare, che, come sappiamo, può alterare significativamente il metabolismo cellulare.

In sostanza, le risposte biologiche delle cellule irradiate nel visibile-vicino infrarosso sono ascritte a cambiamenti chimico-fisici delle molecole fotoaccettrici, in particolare delle componenti della catena respiratoria come NADH-deidrogenasi e citocromo *c* ossidasi. Il passo fondamentale si ritiene sia dovuto ad un'alterazione dello stato redox cellulare: dati sperimentali indicano che la velocità di proliferazione cellulare è connessa con il rapporto NADH/NAD⁺ e con il potenziale redox cellulare.

L'utilizzo della luce monocromatica rossa e nel vicino infrarosso ha effetti benefici nella promozione della guarigione di ferite, lesioni diabetiche, retiniche, ischemiche ecc. (Whelan et al., 2001 e 2003, Eells et al., 2004).

A sostegno di quanto detto poc'anzi un singolo irraggiamento di cellule retiniche con laser He-Ne alla potenza di 83 W/m^2 per 10 minuti induce un incremento lieve ma significativo della proliferazione cellulare; si assiste ad un fenomeno analogo anche irraggiando fibroblasti in fase di crescita esponenziale e in questo caso avviene anche una maggior adesione delle cellule al substrato (Vladimirov et al., 2004).

Risultati preliminari avevano infatti dimostrato un incremento della sintesi del DNA in fibroblasti e cellule del sangue, cellule muscolari, cellule epiteliali (Karu, 1999).

L'irraggiamento di cellule neuronali in coltura, pre-trattate con TTX (blocca i canali Na^+ e causa una riduzione dei livelli di CcOX nei neuroni esaminati), mediante un dispositivo LED-array a 670 nm con intensità di potenza di 50 mW/cm^2 per 80 secondi al giorno (densità di energia di 4 J/cm^2) per cinque giorni, determina una reversibilità degli effetti della TTX, in quanto i livelli della CcOX tornano ad essere paragonabili a quelli dei controlli. Se le cellule neuronali non sono pre-trattate con TTX, un loro analogo irraggiamento induce un incremento significativo dell'attività della CcOX. Il fatto che l'applicazione della luce per soli 80 secondi al giorno sia in grado di attivare e mantenere livelli elevati di attività della CcOX durante quel periodo, indica che l'enzima potrebbe essere l'attivatore primario di una cascata di eventi biochimici comprendenti l'immediata attivazione di geni precoci, l'attivazione di fattori di trascrizione, la sintesi di subunità proteiche e l'attivazione di altre vie metaboliche (Wong-Riley, 2001).

Altro tema importante è quello dello studio dei vari inibitori della citocromo *c* ossidasi e di un loro possibile ruolo nella fotobiomodulazione dell'enzima.

Il trattamento con luce LED a 670 nm e a 4 J/cm^2 di energia luminosa è stato dimostrato essere protettivo contro il danno retinico dovuto ad intossicazione da metanolo. In particolare il metabolita tossico del metanolo, l'acido formico, agisce come inibitore della citocromo *c* ossidasi (Eells et al. 2002, Seme et al. 2001), quindi, di nuovo, questo enzima potrebbe essere cruciale anche in questo caso.

Di recente alcuni ricercatori hanno iniziato ad interessarsi del monossido di azoto (NO) come possibile molecola implicata nell'inibizione reversibile della respirazione cellulare. L'inibizione da NO risulta velocemente reversibile in presenza di O₂, quindi queste due specie molecolari sono sicuramente competitive tra loro sul sito di legame della CcOX (Brunori et al. 1997, Giuffrè et al. 1996 e 2002, Sharpe et al. 1998). Su questa linea possono collocarsi anche gli studi sull'irraggiamento laser di mitocondri volti a valutare il possibile ruolo regolatorio di NO. Questi studi (Vladimirov et al. 2004) sostengono che in assenza di luce la respirazione mitocondriale sia inibita dal NO, sintetizzato dalla NO-sintasi mitocondriale. NO inibirebbe la citocromo *c* ossidasi. L'irraggiamento, quindi la luce, determinerebbe la fotolisi dei complessi eme-NO, riattivando l'enzima e così restaurando la respirazione e la sintesi di ATP.

1.2. Citocromo *c* ossidasi (CcOX): struttura e funzione

La citocromo *c* ossidasi (CcOX), o complesso IV della catena di trasporto degli elettroni, è un complesso enzimatico costituito da diversi componenti proteici immersi nella membrana mitocondriale interna a cui sono associati gruppi prostetici con proprietà redox e con potenziali di riduzione diversi che si collocano in una sequenza precisa.

Il substrato della citocromo *c* ossidasi è la proteina periferica di membrana citocromo *c*, legata alla superficie esterna della membrana mitocondriale interna. Il citocromo *c* si lega alternativamente al componente citocromo *c*₁ del complesso III (coenzima Q:citocromo *c* reduttasi) e alla citocromo *c* ossidasi fungendo da shuttle per gli elettroni tra i due complessi (**Fig. 1.2**).

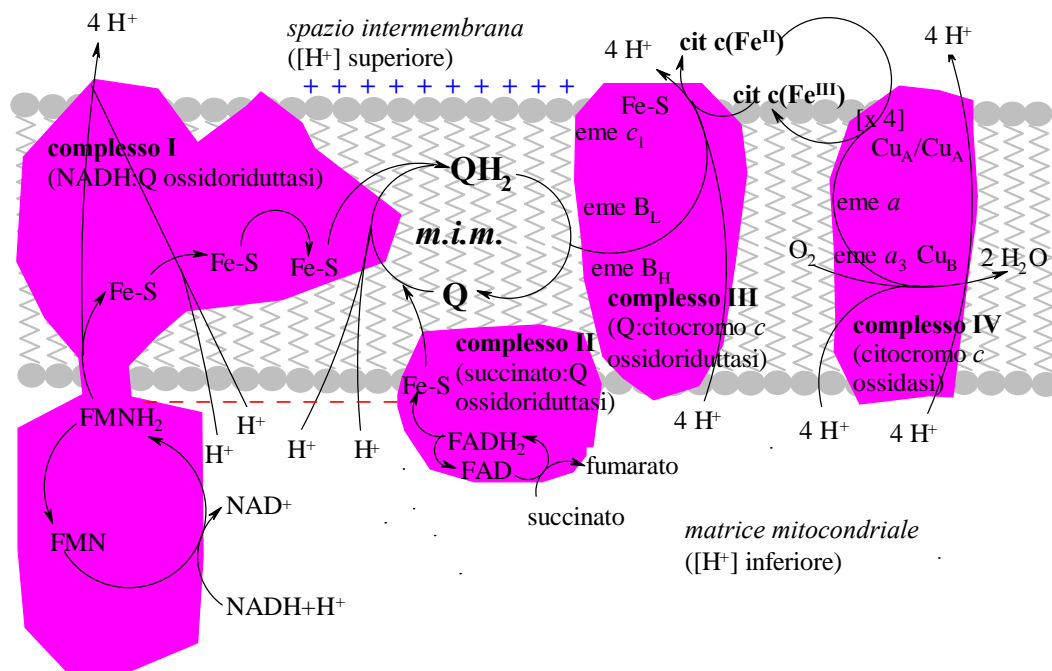


Figura 1.2: La catena di trasporto degli elettroni in uno schema che integra gli elementi strutturali con la dinamica del trasferimento di elettroni e di protoni.

Il processo di trasferimento degli elettroni avviene attraverso la cosiddetta catena di trasporto degli elettroni, al cui livello gli elettroni, ceduti dal NADH e dal FADH_2 , partecipano a meccanismi ossidoriduttivi sequenziali di vari centri, prima di ridurre l'ossigeno molecolare (O_2) ad acqua. Durante questo processo, i protoni vengono espulsi dai mitocondri. L'energia libera conservata nel gradiente protonico che si viene a generare in questo modo guida poi la sintesi di ATP da ADP e P_i attraverso il processo che va sotto il nome di fosforilazione ossidativa. La citocromo c ossidasi catalizza quindi una tappa irreversibile della catena di trasporto degli elettroni, ed è uno degli stadi limitanti della catena di trasporto degli elettroni.

Lo studio dell'attività della citocromo c ossidasi riveste un'enorme importanza sia dal punto di vista biochimico (si tratta di un complesso enzimatico di notevole complessità e dal meccanismo assai interessante) sia dal punto di vista biomedico. Esiste infatti tutta una serie di alterazioni strutturali e funzionali che riguardano il mitocondrio e le varie molecole ad essi associate e che vanno sotto il nome di

citopatie mitocondriali (malattie da anomalia di struttura o funzione dei mitocondri).

Composizione e struttura della CcOX eucariotica (Beauvoit et al 2001)

Il metodo di elettroforesi su gel ad alta risoluzione consente la separazione della CcOX di mammifero in 13 subunità. La struttura cristallografica, presentata di recente, della citocromo ossidasi di cuore bovino assegnava tutte e 13 le subunità al complesso monomerico, ciascuna in quantità equimolari. Le tre subunità maggiori (I, II e III) sono codificate dal DNA mitocondriale e sono sintetizzate all'interno del mitocondrio. Le subunità restanti (IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb, VIIc e VII) sono codificate dal DNA nucleare e sono importate nei mitocondri. Nella struttura cristallografica, le subunità codificate dal nucleo sono associate sulla superficie delle tre subunità centrali, lasciando alcune aree scoperte. Le subunità Va e Vb sono proteine orientate verso la matrice, mentre la subunità VIb è un peptide globulare che si affaccia sul lato citosolico. Le altre 7, su 10 subunità codificate nel nucleo, attraversano la membrana con una lunga elica α . L'enzima si presenta però sotto forma di dimero (**Fig. 1.3**).

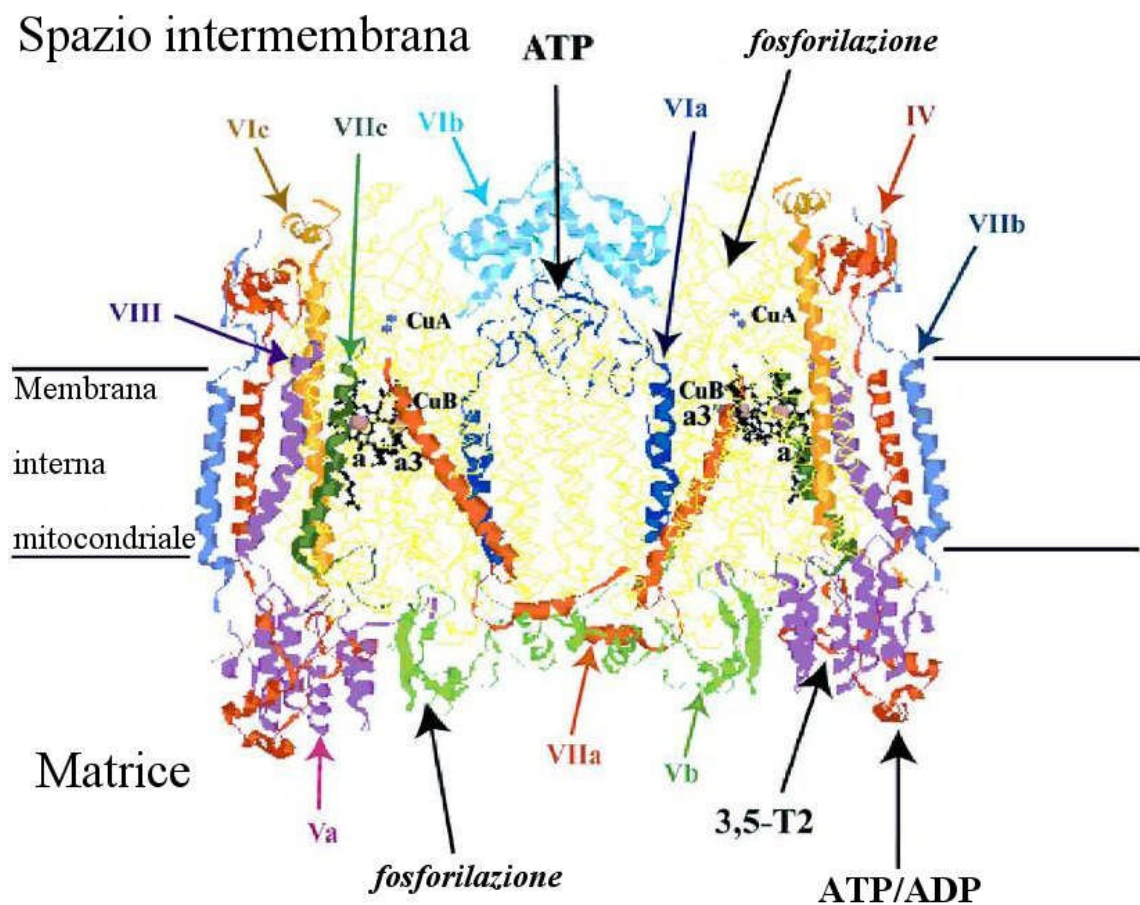


Figura 1.3: *Struttura cristallografica della CcOX dimerica da cuore bovino situata nella membrana mitocondriale interna. È indicata solo l'ossatura (in giallo) per le catene codificate dal mitocondrio: subunità I, II e III. Le 10 subunità codificate nel nucleo sono col modello a nastro in colori. Sono indicati i gruppi eme a e a₃ e gli atomi di ferro e di rame, come pure i siti regolatori per gli effettori [fosforilazioni, ATP, ADP e 3,5-diiodotironina (3,5-T2)].*

Un fattore di trascrizione specifico attiva l'espressione dei geni nei due set genomici. Esso è detto nell'uomo NRF-2 (*nuclear respiratory factor*) e nel topo GABP (*GA binding protein*). Oltre ad attivare direttamente geni per funzioni respiratorie cellulari (come quelli per le subunità CcOX a sede nucleare), GABP/NRF-2 regola il gene nucleare che codifica il fattore A di trascrizione mitocondriale (mtTFA) che agisce nel mitocondrio come regolatore della trascrizione e della replicazione di mtDNA.

La struttura della citocromo *c* ossidasi mitocondriale è stata determinata con tecniche di microscopia elettronica ad una risoluzione migliore di 10 Å (**Fig. 1.4**).

Le subunità I e II come è già stato detto contengono tutti i centri redox attivi: due gruppi eme tipo *a* (*a* e *a*₃) e due centri con atomi di Cu (Cu_A e Cu_B) che alternativamente passano dallo stato di ossidazione +1 a +2.

Il sito bimetallico Cu_A, che riceve gli elettroni dal citocromo *c*, si trova a livello della subunità II, che protrude nello spazio mitocondriale intermembrana.

Studi spettroscopici hanno dimostrato che ciascun Cu_A è legato alla subunità II mediante due residui di Cys e uno di His e la quarta coordinazione (impegnata anch'essa con un atomo di N) fa parte del sito di legame del citocromo *c*.

La coppia metallica Cu_A accetta un elettrone dal citocromo *c* ridotto e, a sua volta, riduce rapidamente l'eme *a*, localizzato a 19 Å di distanza (distanza tra Cu_A e Fe_a).

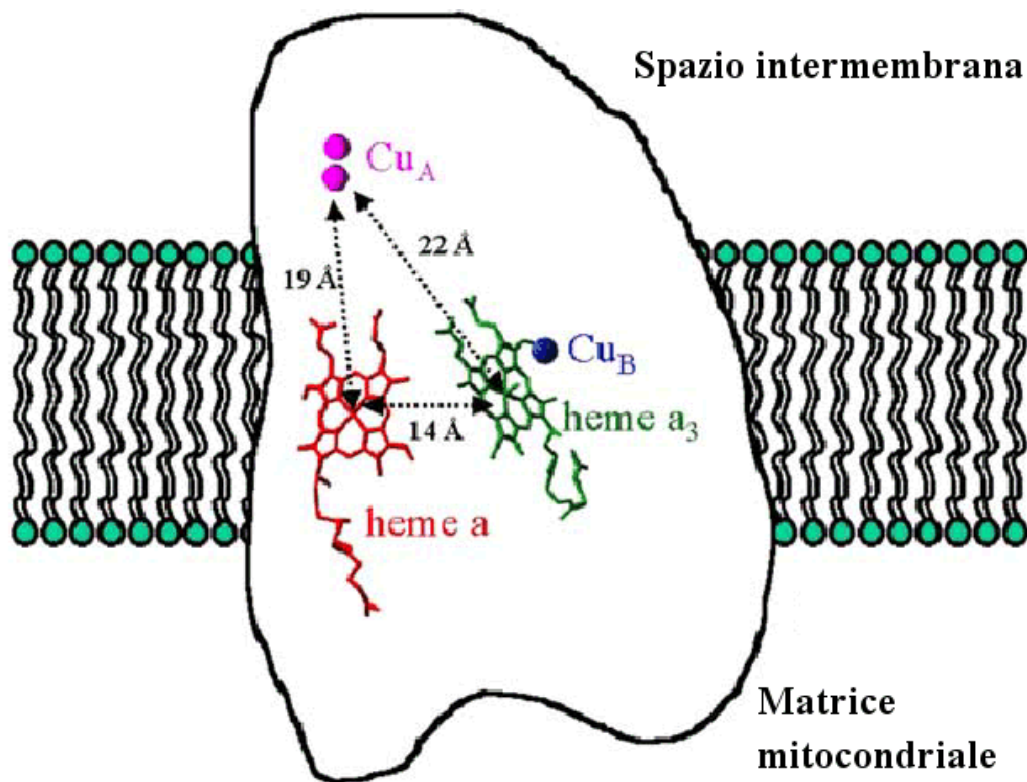


Figura 1.4: *Profilo strutturale della citocromo c ossidasi (Brunori et al, 2005)*

Nell' enzima di cuore di bue è presente uno ione Mg^{2+} all'interfaccia tra la subunità I e la subunità II, legato a His368, Asp369, Glu198 di quest'ultima subunità. Il Glu198 è anche coordinato con Cu_A al carbonile del peptide, suggerendo un ruolo strutturale del Mg^{2+} nella stabilizzazione del Cu_A . Nei batteri il magnesio è sostituito dal manganese. Il sito Mg/Mn, localizzato sopra il gruppo eme a_3 - Cu_B , potrebbe essere coinvolto nel pathway di uscita dei protoni e dell' H_2O dalla proteina (Brunori et al, 2005).

L'eme a è il secondo centro redox dell'enzima: è legato alla subunità I ed è immerso nella porzione intramembranale.

La riduzione dell'eme a da parte del Cu_A è elettrogenica. Sebbene il trasporto degli elettroni avvenga senza riorganizzazione della coordinazione del Fe, sono stati osservati cambiamenti strutturali a questo livello, che potrebbero essere cruciali per il meccanismo di pompaggio protonico (Brunori et al, 2005).

Dall'eme a gli elettroni sono trasportati al sito attivo, eme a_3 e Cu_B , dove si legano i ligandi gassosi O_2 , CO e NO.

I due gruppi eme giacciono a livello dell'elica X della subunità I (**Fig. 1.5**) che espone due His (376 e 378) che legano i due metalli (Brunori et al, 1997).

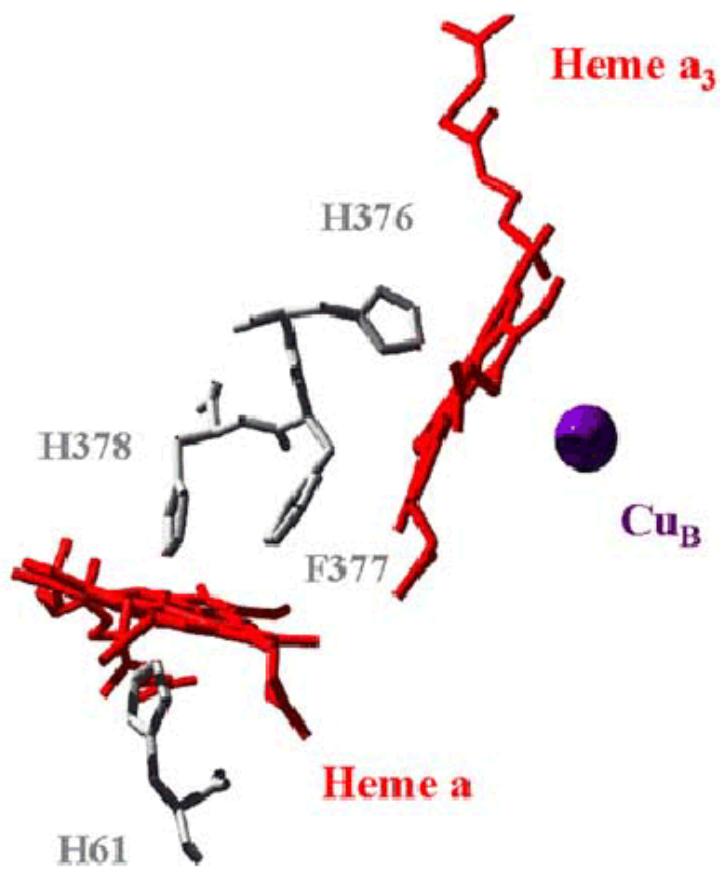


Figura 1.5: Posizione e struttura dei gruppi eme (Brunori et al, 2005)

L'eme a_3 e l'atomo Cu_B formano un complesso binucleare (un sito bimetallico) che comprende il sito di legame dell' O_2 e degli altri ligandi gassosi CO e NO.

Il Fe dell'eme a_3 si trova a 14 Å di distanza dal Fe dell'eme a ; questi due centri redox, entrambi immersi nella subunità I, si trovano più o meno alla stessa profondità nel doppio strato fosfolipidico. Il trasporto elettronico dall'eme a all'eme a_3 è elettrogenico, essendo accoppiato all'uptake dei protoni dalla matrice mitocondriale.

La distanza tra il Fe dell'eme a_3 e il Cu_B , nel caso dell'enzima del cuore di bue, dipende dallo stato redox dell'enzima: 4,9 Å nello stato completamente ossidato e 5,2 Å nello stato completamente ridotto.

L'eme a_3 è coordinato con la His376 sul lato prossimale, mentre Cu_B è coordinato con tre His: 290, 291, 240. In molte citocromo c ossidasi l'His240 instaura anche un legame covalente con la tirosina adiacente (Tyr244). L'effetto del cross-linking

con His240 dovrebbe essere di abbassare il pK_a di Tyr244, rendendo questo residuo un possibile donatore di elettroni per gli intermedi dell' O_2 .

I ligandi gassosi che si legano alla forma completamente ridotta dell'enzima (O_2 e CO) non sembrano indurre particolari cambiamenti conformazionali:

CO si lega al Fe^{2+} dell'eme a_3 in una configurazione tale da suggerire un'interazione molto debole con il Cu_B .

Per questi motivi la citocromo c ossidasi appare essere una proteina piuttosto rigida, che mostra alcuni cambiamenti conformazionali nella reazione di riduzione, ma non dopo il legame dei ligandi.

La regione della proteina vicina al suo centro Cu_A contiene una cavità che forma probabilmente il sito di legame del citocromo c . Il sito di interazione dell'enzima con il citocromo c contiene probabilmente molti residui di Asp e di Glu che riconoscono l'anello basico di residui di Lys del bordo della fessura dell'eme del citocromo c .

Inoltre questi residui formano una corona che contiene al centro quattro catene laterali non cariche; queste catene costituiscono una regione idrofobica che consente un ottimale trasporto degli elettroni.

Si ritiene che esista un solo legame produttivo del citocromo c all'enzima, che coinvolge la superficie esterna delle subunità I e II; si ritiene inoltre che la subunità III abbia un qualche ruolo regolatorio (Brunori et al, 2005). La marcatura differenziale dei gruppi carbossilici della citocromo c ossidasi in presenza e in assenza del citocromo c ha dimostrato che questo protegge i residui invariati Asp112, Glu114 e Glu198 della subunità II. Il Glu198 è localizzato tra due residui di Cys del centro Cu_A . Queste osservazioni confermano le prove spettroscopiche che ponevano il sito di legame del citocromo c sulla subunità II, in vicinanza del centro Cu_A .

Gli elettroni entrano nell'enzima attraverso il centro binucleare Cu_A -citocromo a , e quest'ultimo fa da donatore di elettroni del centro binucleare citocromo a_3 - Cu_B , a livello del quale si lega l' O_2 (Brunori et al, 1997).

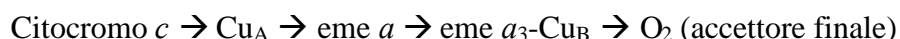
Il ruolo della citocromo c ossidasi, come già descritto sommariamente sopra, è di catalizzare l'ossidazione, a cui prende parte un solo elettrone per volta, di quattro

molecole in sequenza di citocromo *c* ridotto, con la concomitante riduzione a quattro elettroni di una molecola di O₂.

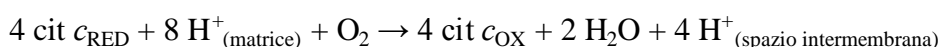
L'eme *a* e i due atomi di Cu del centro Cu_A hanno potenziale redox inferiore (~0,24 V) a quello del centro costituito dall'eme *a*₃ e dall'atomo Cu_B (~0,34 V). Questi potenziali redox in scala permettono il trasporto degli elettroni attraverso i quattro cromofori metallici.

Il trasporto elettronico tra Cu_A e eme *a* è molto rapido, mentre il trasferimento elettronico da quest'ultimo al centro eme *a*₃-Cu_B ossidato sembra essere la tappa più lenta.

Come abbiamo ampiamente descritto, gli elettroni ceduti dal citocromo *c* seguono un ben preciso pathway di riduzione all'interno del complesso enzimatico:



Stechiometria della reazione della citocromo *c* ossidasi:



La riduzione dell'O₂ a due molecole di H₂O da parte della citocromo *c* ossidasi comincia con il legame dell'O₂ nello stato dell'enzima in cui sono presenti il Fe^{II}_{a₃} ed il Cu^I_B [Fe²⁺-O-O-Cu⁺]; mediante una ridistribuzione elettronica interna si riforma l'addotto perossidico stabile Fe³⁺-O-O-Cu²⁺. La riduzione con un elettrone che arriva dal citocromo *c*, insieme all'acquisizione di un protone, converte questo addotto in una miscela di due intermedi Fe²⁺-OH···O⁻-Cu²⁺ e Fe⁴⁺=O²⁻ + ⁻HO···Cu²⁺ (lo stato di ossidazione Fe⁴⁺ è detto ferrile). L'arrivo di un altro elettrone e di un altro protone forma Fe³⁺OH⁻ + ⁻HO···Cu²⁺ che dopo aver legato altri due protoni produce 2 H₂O insieme a Fe³⁺ + Cu²⁺. Infine altri due elettroni riducono sequenzialmente il centro *a*₃-Cu_B a Fe³⁺ + Cu⁺ e a Fe²⁺ + Cu⁺, riportando il complesso bimetallico allo suo stato di ossidazione iniziale (Voet e Voet, 1990).

Durante l'intero ciclo catalitico il complesso enzimatico trae 8 H⁺ dalla matrice mitocondriale: quattro H⁺ sono utilizzati nella formazione di acqua, mentre

quattro H^+ sono pompati nel citoplasma (implicati nella formazione del gradiente protonico necessario alla sintesi di ATP da parte della F_0F_1 -ATPasi).

La reazione di legame dell' O_2 , e degli altri ligandi gassosi NO e CO, con il centro binucleare eme a_3 -Cu_B completamente ridotto è un processo molto rapido. Il pathway cinetico per il legame dei ligandi gassosi e la loro dissociazione dall'eme a_3 coinvolge interazioni transitorie a bassa affinità con il Cu_B ridotto, il quale si presuppone essere localizzato sul canale principale di entrata/uscita dei ligandi nel e dal sito attivo dell'enzima. Sembra quindi che il Cu_B⁺ agisca da porta per i ligandi endogeni, ma la questione è ancora da definire (Brunori et al, 2005). Sembra essere accettato il fatto che CO e O_2 si leghino all'enzima solo quando questo si trovi nella forma completamente ridotta (Fe^{2+} -Cu_B⁺), mentre il legame di NO avviene anche quando il centro binucleare è parzialmente ossidato.

La lenta riduzione dell'eme a_3 , osservata nell'enzima completamente ossidato, di cui abbiamo poc'anzi parlato, potrebbe essere funzionalmente connessa con il trasferimento dei protoni (in fase di studio, Brunori et al, 2005).

Citocromo c ossidasi di lievito:

La citocromo ossidasi del lievito *Saccharomyces cerevisiae* è molto simile all'enzima di mammifero. Quello di lievito è stato risolto in 11 subunità per filtrazione su gel ed elettroforesi. (Tabella 1).

Come riportato in tabella, la subunità V dell'enzima di *S. cerevisiae* che corrisponde alla IV dei mammiferi, esiste in due isoforme intercambiabili, Va e Vb, codificate da due geni distinti, le quali hanno identità di struttura primaria del 66%. La commutazione da isoforma Va a Vb avviene a basse tensioni di O_2 (Burke et al. 1997).

Tabella 1. Omologia tra subunità codificate nel nucleo per CcOX di mammifero e di *S. cerevisiae*, e fenotipi dei rispettivi ceppi di lievito con delezione.

Subunità di mammifero	Controparte di lievito	Gene nel lievito	Fenotipi del ceppo di lievito con delezione
IV	Va, Vb	COX5A e COX5B	Respirazione cellulare e montaggio di CcOX assenti Cambiamento di isoforma a bassa pO_2
Va	VI	COX6	Respirazione cellulare e montaggio di CcOX assenti
Vb	IV	COX4	Respirazione cellulare e montaggio di CcOX assenti
VIa	VIa	COX13	Respirazione e contenuto di COX normali Perdita di un sito di legame per ATP su COX Assenza di attivazione di COX da ATP
VIb	VIb	COX12	Basso contenuto di COX Moderato calo nella respirazione
VIc	VIIa	COX9	Respirazione cellulare e montaggio di CcOX assenti
VIIa	VII	COX7	Respirazione cellulare e montaggio di CcOX assenti
VIIb	—	—	—
VIIc	VIII	COX8	Moderato calo nella respirazione e nell'attività CcOX
VIII	—	—	—

Per quanto riguarda le subunità Va (normossica) e Vb (ipossica), è interessante il fatto che la delezione dei relativi geni codificanti inficia totalmente il montaggio dell'enzima (Mc Ewen et al., 1984). Inoltre nelle cellule di lievito che esprimono solo l'isoforma ipossica Vb della subunità, la CcOX ha cinetica differente rispetto alle cellule aerobiche di lievito che esprimono solo l'isoforma Va della subunità (Waterland et al. 1991; Tabella 1).

Questa è un'indicazione interessante dal punto di vista sia strutturale che funzionale, dal momento che *S. cerevisiae* è un organismo anaerobio facoltativo.

Un'altra subunità dell'enzima di *S. cerevisiae* la cui delezione induce crescita su fonti di carbonio fermentabili (crescita anaerobia) con conseguente attività respiratoria e contenuto di CcOX notevolmente diminuiti, è la VIb (COX12) (LaMarche et al. 1992).

1.3. Interazioni fra CcOX e nucleotidi adenilici (ATP, ADP)

Sebbene, come enunciato sopra, il flusso di trasferimento elettronico attraverso il complesso sia controllato principalmente dalle forze termodinamiche associate, ossia il salto nel potenziale redox tra O₂ e citocromo *c* e la forza protomotrice, il flusso elettronico dipende anche da vari effettori cinetici, tra cui i nucleotidi adenilici (ATP e ADP). Anche se il numero di siti di legame per ATP e ADP sulla citocromo ossidasi è ancora argomento dibattuto, esperimenti eseguiti sull'enzima solubilizzato e ricostituito forniscono prove funzionali solide che la citocromo *c* ossidasi di mammifero lega nucleotidi adenilici su entrambi i lati della membrana interna. Questi effetti includono la modificazione dell'affinità per il citocromo *c*, l'inibizione allosterica e cambiamenti nell'efficienza di pompaggio protonico. Indagini immunologiche hanno evidenziato il ruolo della subunità IV e di una proteina che lega ATP, la subunità VIa, in queste regolazioni cinetiche.

Sono stato condotti negli anni numerosi esperimenti volti ad indagare la regolazione della CcOX da parte di ATP e ADP.

Attualmente si considerano tre siti di regolazione sull'enzima di mammifero, mentre ne è stato individuato uno solo sull'enzima batterico di *Paracoccus denitrificans* (Rieger et al. 1995).

Recentemente, mediante studi di fotomarcatura covalente con 2-azido[$\gamma^{32}\text{P}$]ATP è stata confermata la presenza di un sito di legame per ATP sulla subunità VIa di CcOX isolata da lievito, cuore e rene di bue (Taanman et al. 1994). Tali esperimenti hanno confermato che il sito di legame per ATP è conservato nella subunità da specie differenti e anche in differenti isoforme.

Dal punto di vista della regolazione dell'attività catalitica della CcOX da parte dei nucleotidi adenilici, è stato osservato da alcuni studi sperimentali che in presenza di alti rapporti ATP/ADP, si otteneva una curva di titolazione sigmoide, con

inibizione completa dell'attività CcOX fino a citocromo *c* 4 μM . Con rapporti ATP/ADP decrescenti, la curva di titolazione sigmoide diventava iperbolica e l'attività massima di CcOX misurata a saturazione di citocromo *c* aumentava notevolmente. Questi risultati indicano che alti rapporti ATP/ADP esercitano un'inibizione allosterica sulla citocromo *c* ossidasi solubilizzata (Arnold et al., 1997).

Quindi il rapporto ATP/ADP gioca un ruolo fondamentale nella regolazione dell'attività catalitica della CcOX. Chiaramente essendo un complesso cruciale per la bionergetica cellulare, esistono vari sistemi che ne regolano l'attività, come vie di segnalazione mediate da ormoni tiroidei e come vie di fosforilazione dipendenti da cAMP.

La regolazione della CcOX è riassunta schematicamente in Tabella 2.

Tabella 2 – Regolazione dell'attività COX da alcuni effettori per i quali sono identificate le subunità coinvolte.

Effettori	Subunità implicata	Effetti cinetici sulla CcOX
Anioni aspecifici	subunità VIb rimossa	Attivazione
3,5-diiodotironina	Legame alla subunità Va	Rilascia la cooperatività di legame del citocromo <i>c</i>
Fosforilazione dipendente da cAMP	Fosforilazione di subunità II (e/o subunità III) e subunità Vb	Promuove l'inibizione allosterica della COX da ATP
Defosforilazione e dipendente da Ca^{2+}	—	Previene l'inibizione allosterica della COX da ATP
ATP contro ADP esterni	Legame sulla subunità VIa	Attivazione (a bassa forza ionica) da ATP Aumento della stechiometria H^+/e^- da ATP (lievito)
ATP contro ADP interni	Legame sulla subunità IV	Inibizione tessuto-specifica della COX di mammifero da ATP Inibizione allosterica da alto rapporto ATP/ADP Calo della stechiometria H^+/e^- da alto rapporto ATP/ADP (mammiferi)

Infine studi condotti su mitocondri isolati di lievito hanno contribuito in modo originale a capire la rilevanza fisiologica della regolazione di COX da nucleotidi adenilici. Una delle spiegazioni proposte, che va nella stessa direzione di quanto ampiamente descritto sopra, è il nesso allosterico tra la catena respiratoria e l'ATP sintasi (Padan et al. 1973; Azzone et al 1977) che porta a una variazione nella risposta della captazione di O₂ al Δp .

1.4. Inibitori della CcOX

Esistono numerose sostanze che agiscono come inibitori della CcOX, quali formiato di ammonio (HCOONH₄), sodio azide (NaN₃) e cianuro di potassio (KCN).

Per una completa trattazione su formiato di ammonio e sodio azide nella loro veste di inibitori enzimatici si rimanda agli articoli di Nicholls (1975) e Nicholls (1976).

Il formiato inibisce la CcOX con una K_i apparente compresa tra 5 e 30 mM a pH 7,4. Il sito di attacco del formiato è accessibile nello stato completamente ossidato ($a^{3+} a_3^{3+}$) e nello stato parzialmente ridotto ($a^{2+} a_3^{3+}$), quindi in condizioni di ossigenazione.

Non è accessibile nello stato completamente ridotto ($a^{2+} a_3^{2+}$), cioè quando il sistema è in condizione di anaerobiosi (in questo caso il formiato cessa la sua attività inibitoria).

L'azide compete col formiato al livello del sito di attacco e inibisce l'enzima indipendentemente dal suo stato redox.

Il tasso di legame del formiato e la sua apparente affinità incrementano quando il pH diminuisce, suggerendo che l'acido formico (HCOOH) sia la molecola implicata nell'inibizione. A pH 7,4 l'inibizione richiede alcuni minuti per completarsi, ma a valori di pH più bassi l'effetto è più veloce.

L'acido formico si lega alla sesta posizione di coordinazione del ferro ferrico nel citocromo a_3 (eme a_3), formando un complesso ferrico ad alto spin non riducibile da parte degli elettroni dal citocromo c .

L'aggiunta di 7,25 mM di formiato ad una miscela di ascorbato, citocromo *c* ossidasi e tampone cambia il valore di stato stazionario dal 39% al 55% di riduzione, indicando quasi il 50% di inibizione dell'enzima. Risultati analoghi sono ottenuti con l'elettrodo a ossigeno, ma con valori di K_i apparente maggiori.

La sodio azide è un'inibitore più potente del formiato di ammonio (0,7 mM azide induce circa 84% di inibizione dell'enzima con K_i circa 0,13 mM). La misura ossigrafica anche in questo caso dà valori di K_i leggermente più alti (Nicholls, 1975). Quindi le K_i di queste due sostanze misurate con elettrodo di Clark sono costanti di inibizione apparenti.

Il motivo per cui le costanti di inibizione misurate ossigraficamente sono apparenti è legato al fatto che gli inibitori in questo caso si trovano in competizione con l'ossigeno, quindi la loro affinità per il sito attivo dell'enzima non sarà analoga a quella in condizione di anaerobiosi.

Nel caso dell'acido formico, inoltre, a pH 7,4 esso si trova in gran parte nella sua forma dissociata, quindi la costante di inibizione in questo caso è ulteriormente sovrastimata.

Si può pensare che azide e acido formico competano per un comune sito di legame a livello della CcOX (Nicholls, 1975). Si riportano qui di seguito le misure ossigrafiche dell'attività inibitoria di azide e formiato nei confronti di citocromo *c* ossidasi purificata e isolata (Remedi A., 2005 Tesi di Laurea) (**Figg. 1.6 e 1.7**).

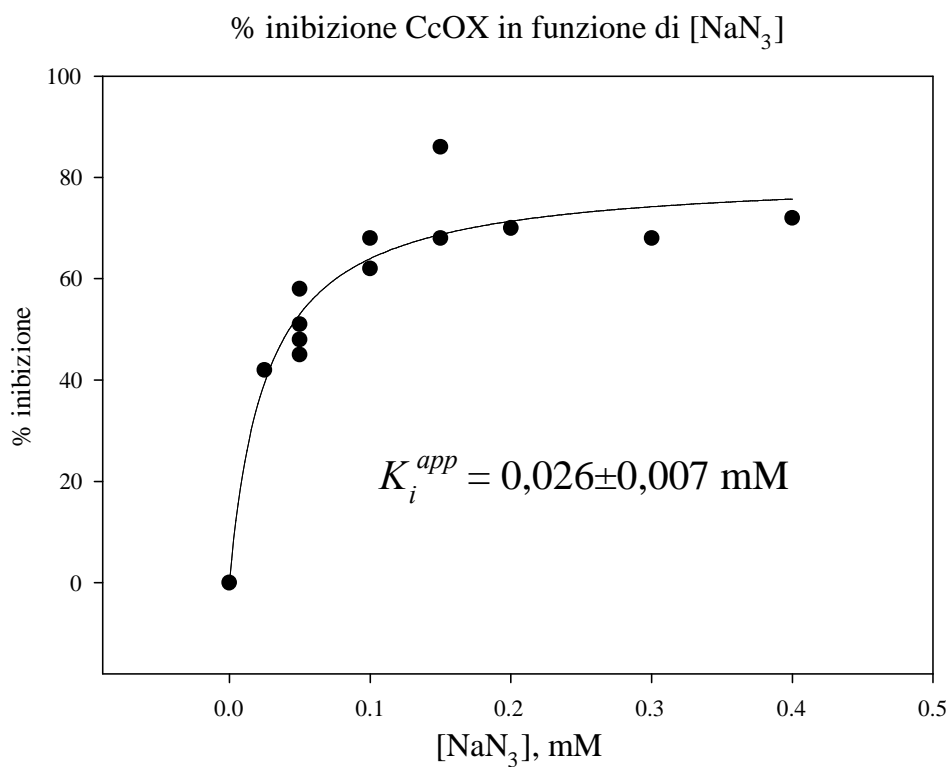


Figura 1.6. *Grafico di inibizione della CcOX da sodio azide.*

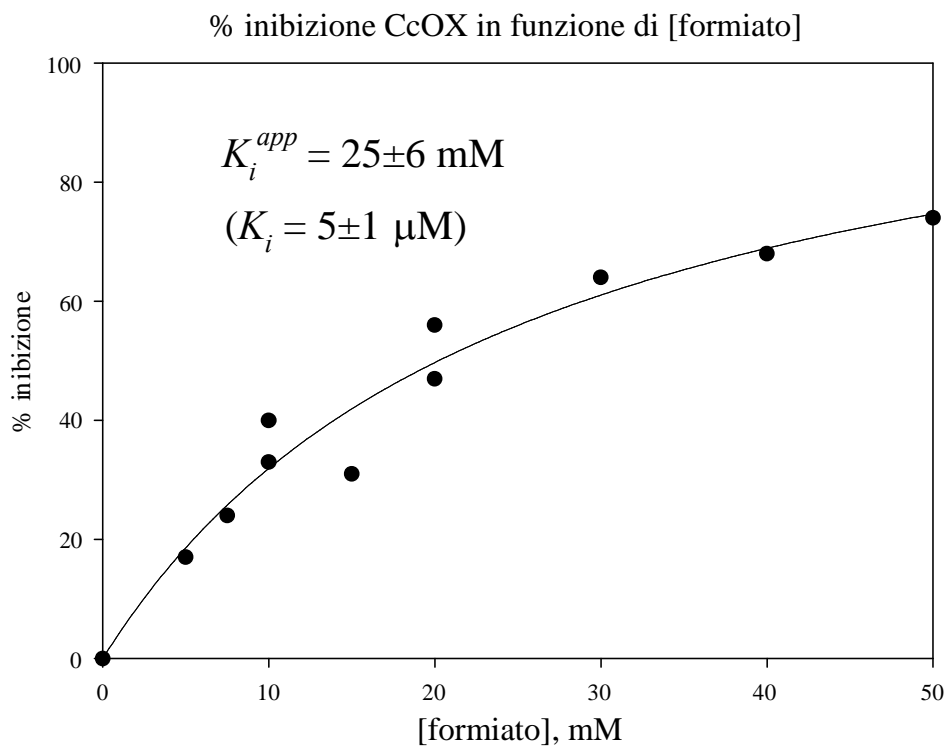


Figura 1.7: *Grafico di inibizione della CcOX da formiato di ammonio.*

1.5. DNA barcoding e CcOX

Il DNA barcoding è una metodica molecolare che è stata sviluppata per la caratterizzazione di entità sistematiche morfologicamente non distinguibili, basandosi sull'analisi della variabilità di un marcatore molecolare. Vale la pena citare in questa tesi che il marcatore principale attualmente utilizzato è un frammento del gene mitocondriale codificante la subunità I della citocromo *c* ossidasi, *coxI*. Questo marcatore, infatti, sembra poter aiutare a risolvere la problematica della diversità. Studi sperimentali hanno validato la capacità della sequenze di CoxI nel distinguere le specie in alcuni gruppi tassonomici. I risultati indicano che sequenze divergenti della CoxI consentono di distinguere le specie in tutti i *phyla* animali eccetto gli Cnidari (Hebert et al., 2003).

1.6. Modelli biologici

Tetrahymena thermophila

Tetrahymena thermophila è un microrganismo unicellulare provvisto di cilia, che ha dimensioni che vanno da 50 a 100 micron in lunghezza e da 20 a 50 micron larghezza. Esso appartiene al regno dei **Protisti**,

Phylum: *Ciliophora*

Subphylum: *Intramacronucleata*

Class: *Oligohymenophorea*

Subclass: *Hymenostomatia*

Genus: *Tetrahymena*

Species: *Tetrahymena thermophila*

Le cellule di *T. thermophila* (**Fig 1.8**) sono molto utilizzate in campo sperimentale perché possono crescere in condizioni axeniche, hanno una discreta resistenza alla temperatura, hanno un ciclo cellulare piuttosto breve e, recentemente, ne è stato sequenziato il genoma. Tutto ciò ha reso questo ciliato un vero e proprio modello biologico.

Per una descrizione dettagliata di questo ciliato si veda il testo di Asai e Forney (2000).

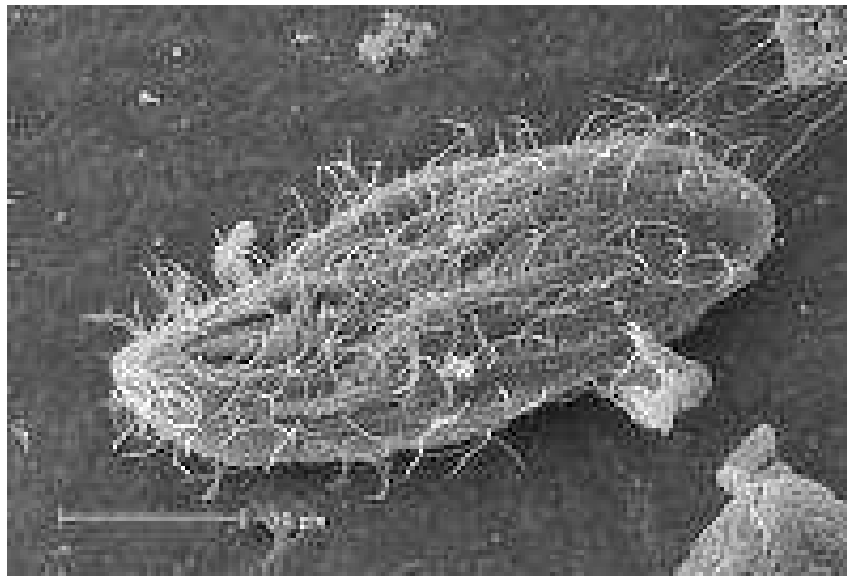


Figura 1.8: Fotografia di cellula di *T. thermophila* al microscopio elettronico a scansione (SEM).

Fra le caratteristiche che *T. thermophila* condivide con altri ciliati si può menzionare la presenza di un micronucleo genomico responsabile dei fenomeni di ricombinazione genetica e di un macronucleo a funzione vegetativa che contiene molteplici copie di molecole di DNA a dimensione di gene (Prescott, 1994). Il micronucleo è implicato nella coniugazione, mentre il macronucleo nella divisione cellulare, detta in questo caso “amitosi” per l’assenza della formazione del fuso mitotico. Altra caratteristica è la diversità del codice genetico nel quale i codoni, che gli altri organismi utilizzano come stop, sono invece codificanti.

T. thermophila attua una respirazione aerobia (Hill 1972; Schrago and Elson 1980) e, caratteristica peculiare di questo ciliato, ha numerosi mitocondri all’interno dei quali sono localizzati gli enzimi respiratori (Blum 1996). I mitocondri di *T. thermophila* sono presenti all’interno del citoplasma, ma sono più concentrati nella *cortex* cellulare, direttamente sottostante all’epiplasma (scheletro della membrana). La loro disposizione è coordinata con quella del pattern microtubulare della *cortex*, sebbene nelle misure con marcatori diretti quest’ultimi si vedano per lo più sulla membrana scheletrica.

Alcuni studi svolti su *T. pyriformis*, che si può considerare proveniente dalla stessa linea filogenetica e morfologicamente molto simile a *T. thermophila*, evidenziano che questi microrganismi contengono enzimi respiratori terminali dotati di citocromi tipo *a* con spettri di assorbimento tipici delle CcOX, ossia aventi picchi di assorbimento intorno 420-450 nm e 620 nm. (Lloyd et al. 1972).

La scelta di questo microrganismo eucariotico unicellulare per i nostri studi era legata al fatto che, come detto sopra, è facilmente coltivabile in coltura axenica, è resistente e le colture raggiungono densità cellulari elevate. Inoltre, esse sono dotate di una notevole attività respiratoria grazie alla presenza di un numero elevato di mitocondri per unità di volume. Alla luce dei risultati ottenuti è ragionevole considerare *T. thermophila* come un ottimo modello biologico per questo tipo di studi.

Saccharomyces cerevisiae

Il lievito *S. cerevisiae* è un organismo unicellulare appartenente al regno dei **Funghi**,

Phylum: *Ascomycota*

Subphylum: *Saccharomycotina*

Class: *Saccharomycetes*

Order: *Saccharomycetales*

Family: *Saccharomycetaceae*

Genus: *Saccharomyces*

Species: *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae è sicuramente uno degli organismi maggiormente studiati da ogni punto di vista in campo biologico: è considerato infatti un modello biologico in citologia e genetica e, com'è noto, è stato il primo eucariote il cui genoma è stato completamente sequenziato. Esistono due forme di lievito: aploide e diploide. Le cellule aploidi si dividono effettuando la mitosi, e in condizioni di stress elevato muoiono. Le cellule diploidi compiono anch'esse la mitosi, ma in condizioni di stress vanno incontro a sporogenesi, compiono la meiosi e danno origine ad una varietà di spore aploidi che possono poi coniugare fra loro. Le cellule hanno dimensioni medie di 5-10 μm e sono di forma ellittica o sferica (**Fig 1.9**).

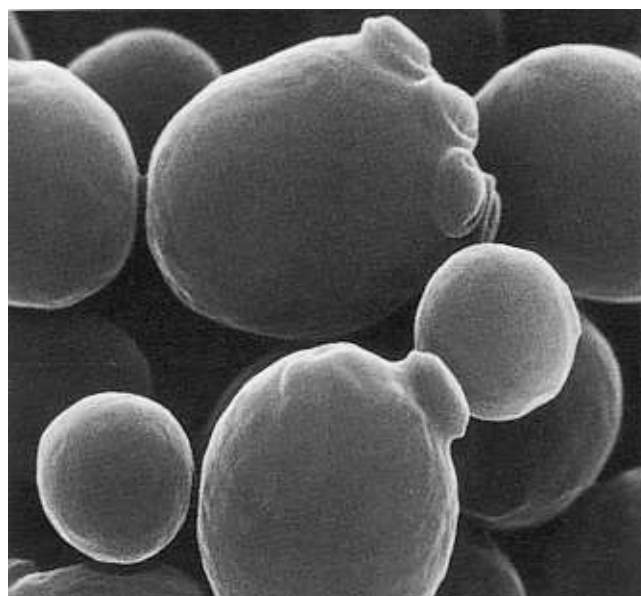


Figura 1.9: Cellule di *S. cerevisiae* al microscopio elettronico a scansione (SEM).

Nonostante abbia una biologia piuttosto complessa, sono stati approfonditi molti aspetti sul suo metabolismo e, tuttora, grazie alle numerose somiglianze funzionali con le cellule umane, è uno degli organismi più utilizzati nello studio dei meccanismi molecolari alla base di diverse patologie, come il diabete. Infatti molte proteine importanti nella biologia umana furono scoperte studiando le proteine omologhe del lievito, tra cui proteine implicate nel ciclo cellulare, proteine segnale, proteine enzimatiche.

Dal punto di vista biochimico, *S. cerevisiae* è un organismo anaerobio facoltativo, infatti attua una respirazione aerobia in presenza di ossigeno, mentre, in sua assenza, passa alla respirazione anaerobica (fermentazione). I lieviti fermentanti producono energia convertendo gli zuccheri in anidride carbonica e etanolo.

Le caratteristiche strutturali e funzionali della citocromo *c* ossidasi di lievito sono state largamente descritte sopra. Vale la pena aggiungere che alla base del metabolismo aerobio e anaerobio c'è una differenza di espressione genica e quindi un contenuto differenziale delle proteine implicate nella respirazione e nel metabolismo energetico. Uno studio recente (Ohlmeier et al., 2004) mostra che in seguito a *shift diauxico*, cioè al passaggio dalla fermentazione (cellule cresciute in terreno arricchito in glucosio) alla respirazione aerobia (cellule cresciute in terreno arricchito in glicerolo) l'espressione del gene Cox4, uno dei geni per la CcOX, aumenta considerevolmente. In **Fig. 1.10**, è riportato il risultato di una elettroforesi bidimensionale che mostra la differente induzione di alcune proteine implicate nella respirazione in cellule che attuano fermentazione rispetto a cellule che attuano respirazione aerobia.

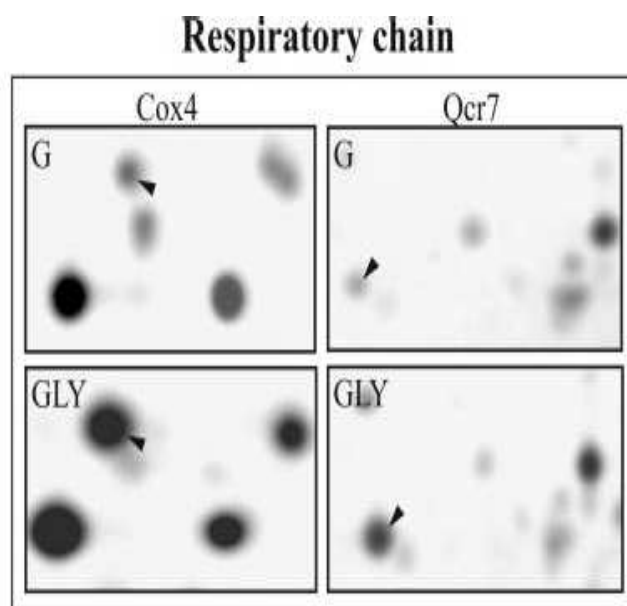


Figura 1.10: Induzione differenziale di proteine implicate nella respirazione cellulare, come Cox4, che fa parte del complesso IV (citocromo c ossidasi), in cellule che crescono fermentando glucosio (G) e in cellule che crescono in aerobiosi su glicerolo (GLY). (da Ohlmeier et al., 2004).

Quindi il passaggio dalla condizione anaerobia alla condizione aerobia e viceversa, fa sì che *S. cerevisiae* non solo muti il proprio metabolismo energetico, ma riorganizzi significativamente il proprio assetto proteico ottimizzando la sua fisiologia in una direzione piuttosto che nell'altra.

Le caratteristiche di *S. cerevisiae* sopra descritte, in particolare la capacità di crescere sia in condizioni aerobie che anaerobie e il fatto che, alla base di queste due condizioni, vi sia una documentata differenza nell'espressione genica e nella sintesi di proteine implicate nella respirazione, rendono queste cellule un modello valido per indagare ulteriormente i possibili effetti della luce sulla respirazione.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Coltivazione dei tipi cellulari utilizzati

Coltivazione delle cellule di *Tetrahymena thermophila*

Il terreno di coltura di *T. thermophila* da noi usato ha la seguente composizione: 2% peptone, 0,2% estratto di lievito, 0,003% ferro-EDTA in H₂O milliQ.

Dopo sterilizzazione in autoclave, per ogni litro di terreno di coltura, si aggiungono 10 mL di una soluzione antibiotico-antimicotico composta da penicillina-streptomicina (Pen-Strep) e anfotericina B (Fungizone). Il mix antibiotico-antimicotico contiene una concentrazione di antibiotico dieci volte maggiore di quella dell'antimicotico.

Le colture sono mantenute alla temperatura di 25°C e per ottimizzare lo scambio gassoso è stato usato un alto rapporto superficie di scambio/volume complessivo della coltura. In media le cellule hanno un tempo di divisione di circa 2 ore. In letteratura le colture sono considerate in crescita esponenziale fino alla densità di circa 275000/mL e in fase stazionaria quando raggiungono una densità di circa un milione per millilitro.

Dato che il complesso Fe-EDTA avrebbe potuto creare artefatti durante le misure con l'elettrodo di Clark, sono state utilizzate colture con terreni privi di Fe-EDTA. Per questo motivo è stata attentamente monitorata la crescita delle cellule in presenza e in assenza di Fe-EDTA e si può ragionevolmente affermare che l'assenza di Fe-EDTA rallenta lievemente il tempo di divisione cellulare, senza alterare né la vitalità delle cellule né la loro attività respiratoria.

Coltivazione delle cellule di *Saccharomyces cerevisiae*

Gli esperimenti con cellule del lievito *Saccharomyces cerevisiae* sono stati effettuati con la collaborazione della Dr. Renata Del Carratore. Le cellule del ceppo diploide RS112 (Schiestl et al 1988, 1989) di *S. cerevisiae* (MATa/a ura3-52/ura3-52, leu2-3, 112/leu2-D98 trp5-27/TRP arg4-3/ARG ade2-40/ade2-101 ilv-92/ILV HIS3: pRS6/his3-D200 LYS/ lys2-801) erano coltivate a 30°C in

terreno standard YAPD: 2% peptone, 1% estratto di lievito e 30mg/L di adenina solfato. Questo terreno era arricchito con 2% o 5% di glicerolo per ottimizzare la crescita aerobia, mentre il 2% di glucosio era aggiunto nel caso in cui si volesse ottenere una condizione di semi anaerobiosi.

Coltivazione cellule di *S. cerevisiae* mutanti E' stato usato anche un ceppo mutante di *S. cerevisiae* che mancava della subunità VIb della CcOX, individuata con il nome di COX12.

Il ceppo mutante è il BY4741-COX12 (his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YLR038c::kanMX4) (Euroscarf Collection) (La Marche et al.1992).

Essendo questo mutante un ceppo aploide quindi diverso dal *S. cerevisiae* usato negli altri esperimenti, abbiamo effettuato misure di controllo anche sul relativo ceppo aploide wild-type BY4741 (MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0).

Per questi due ceppi al terreno di coltura YAPD standard erano aggiunti i seguenti amminoacidi: adenina, L-triptofano e L-isoleucina.

2.2. Apparato sperimentale.

Il sistema sperimentale utilizzato consiste di tre sezioni: l'apparato di irraggiamento, la sezione di misura propriamente detta (elettrodo di Clark), la parte di acquisizione e analisi in tempo reale dei dati. Il sistema nel suo insieme è rappresentato nella fotografia di **Fig. 2.1**; i suoi componenti sono schematizzati in **Fig. 2.2**.

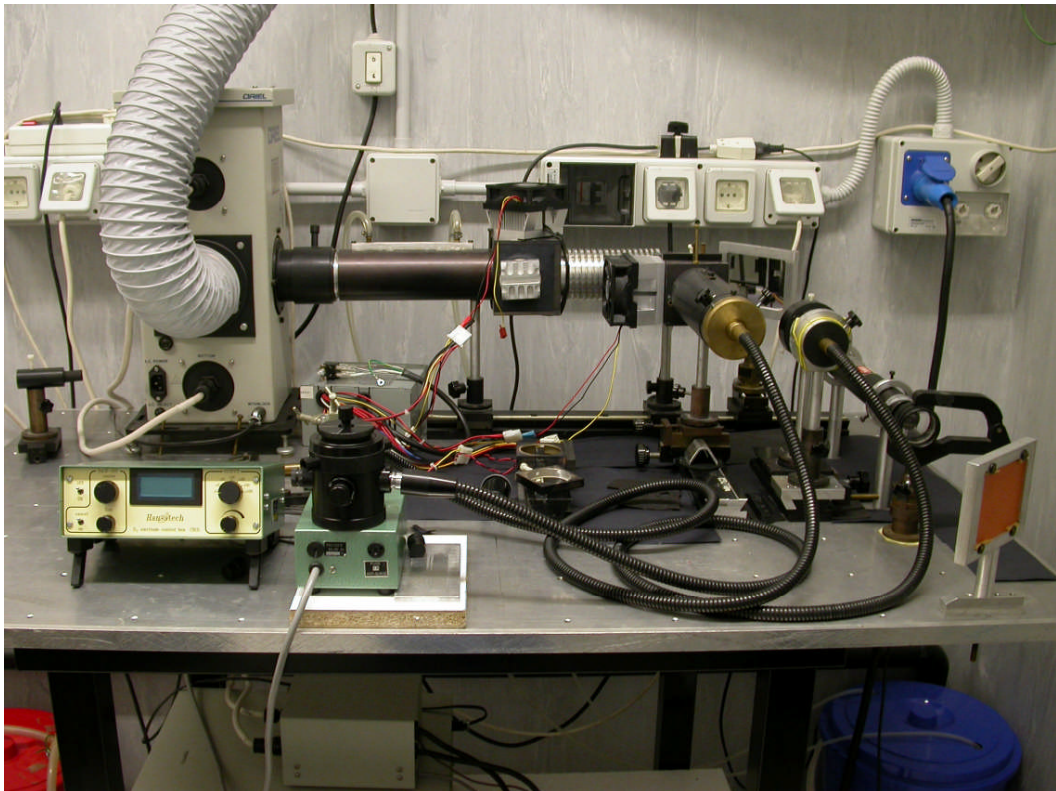


Figura 2.1: *Fotografia dell'apparato sperimentale.*

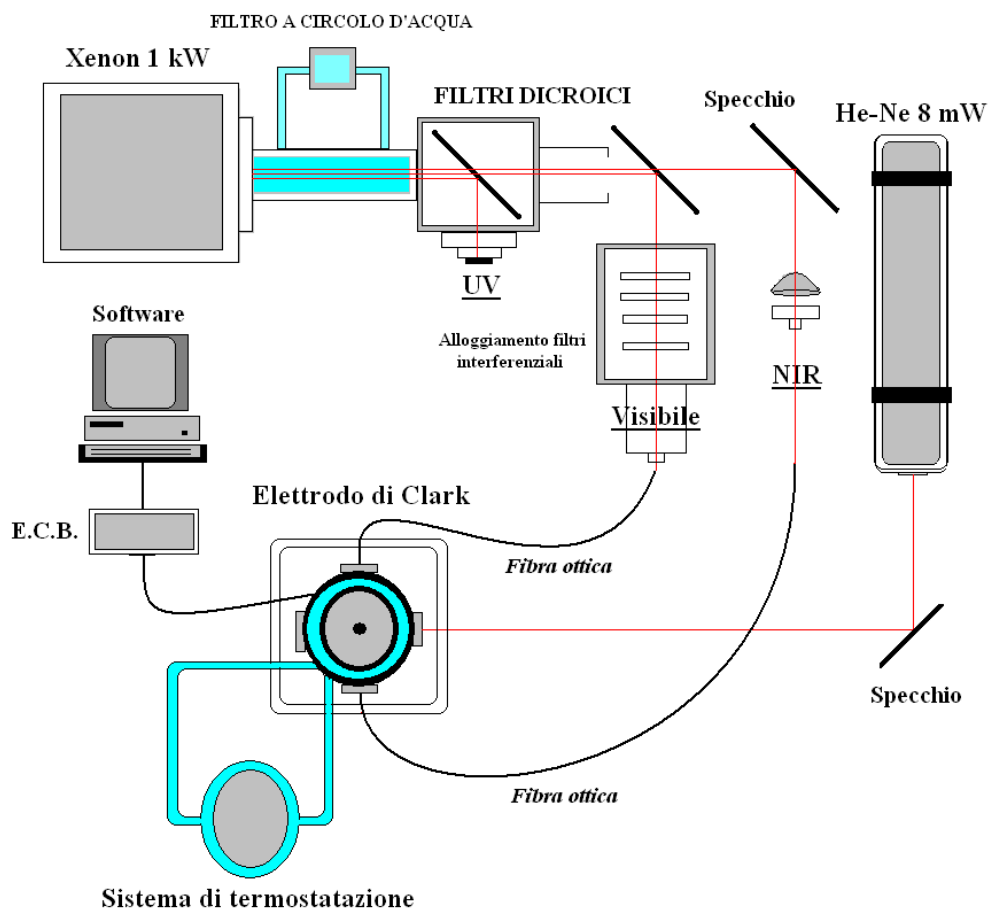


Figura 2.2: Schema che illustra i dettagli dell'apparato sperimentale.

2.2.1 Set-up per l'irraggiamento

Per gli irraggiamenti abbiamo usato due diversi tipi di sorgenti luminose: un laser He-Ne con potenza nominale di 8 mW e lunghezza d'onda di 632,8 nm; una lampada ad arco a vapori di Xenon con una potenza nominale di 1 KW.

La luce del laser He-Ne è stata convogliata all'interno dell'elettrodo grazie ad uno specchio posizionato a 45° rispetto alla direzione di provenienza della luce laser (v. schema in **Fig. 2.2**). L'irradianza totale sul campione misurata con un radiometro è di circa 0,3 W/m².

La radiazione della lampada ad arco a vapori di Xenon, che ha emissione continua dall'ultravioletto sino all'infrarosso (da circa 250 nm a circa 2500 nm) e valori di intensità abbastanza costanti lungo tutto lo spettro di emissione, è stata divisa in tre distinte bande per mezzo di due filtri dicroici posti in serie tra loro. Le bande

così ottenute erano: UV (250–400 nm), visibile (400–715 nm), vicino infrarosso (715–1000 nm). La parte di infrarosso più lontana, e, di conseguenza, parte del calore emesso dalla lampada, vengono tagliati da un filtro a flusso continuo di acqua.

La luce così selezionata è stata convogliata su tre distinte fibre ottiche che permettono l'irraggiamento diretto del campione all'interno della camera di misura dell'elettrodo Clark. Con questo sistema ottico era possibile irraggiare il campione *contemporaneamente* con più bande luminose, semplicemente inserendo le tre fibre ottiche negli ingressi presenti sul dispositivo della camera (schema **Fig. 2.2**).

Un'ulteriore selezione della radiazione luminosa era effettuata utilizzando diversi tipi di filtri ottici posti a monte delle fibre. Interferenziali band-pass a banda larga con larghezza di banda a metà altezza di 50nm (FWHM=50nm) e a banda stretta FWHM=10nm. Interferenziali short-pass che tagliano le lunghezze d'onda superiori al valore nominale; non interferenziali long-pass che tagliano le lunghezze d'onda inferiori al valore nominale. I principali filtri usati per gli irraggiamenti sono:

Filtri band-pass: Balzer: K1, K45, K50, K55, K60 centrati rispettivamente a 420, 450, 500, 550 e 600 nm (FWHM=50nm); Balzer: B40 630 ± 12.5 nm, B812 812 ± 7 nm.

Filtri short-pass: Laser Optronics LS550 e LS600 (selettivi rispettivamente per la radiazione < di 550 e di 600 nm).

Filtri long-pass: Schott OG 570 (selettivo per la radiazione > 570 nm).

Per selezionare la radiazione infrarossa (NIR = near infrared radiation) abbiamo usato in serie il long-pass Schott RG715 (> 715nm) e il B812.

L'irradianza della luce ottenuta con questi filtri è stata misurata con diversi tipi di strumenti tra cui due spettroradiometri che hanno entrambi un Optical Multi Array come rivelatore della luce, ma differenti caratteristiche ottiche ed elettroniche. Gli spettri di irradianza dei vari filtri usati sono mostrati in **Fig. 2.3**.

Prima di ogni esperimento l'intensità veniva comunque misurata con un radiometro, per avere così un controllo costante dell'irradianza utilizzata.

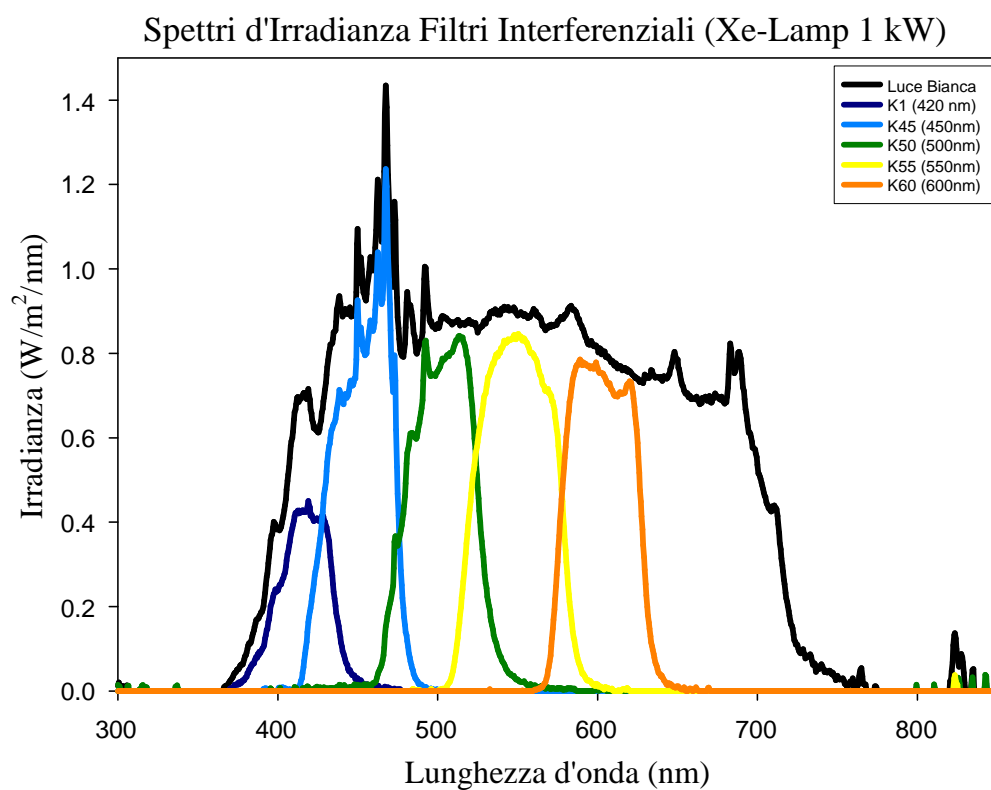
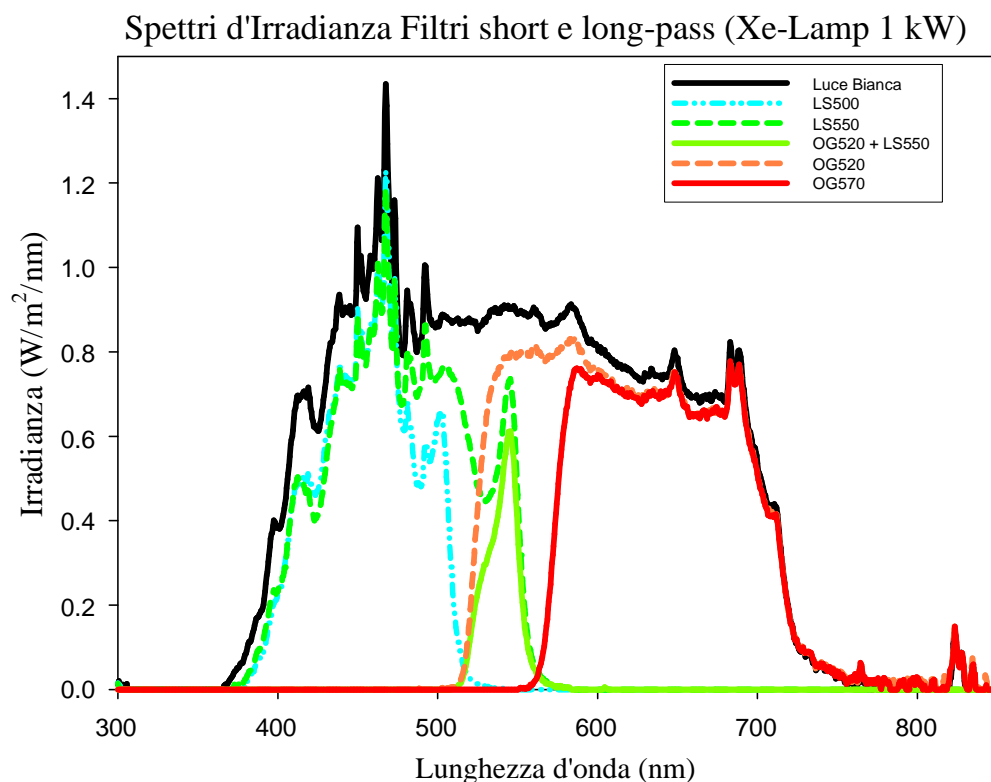


Figura 2.3. Irradianze dei differenti filtri usati per gli irraggiamenti. Il grafico in alto mostra le irradianze dei filtri short-pass e long-pass, il grafico in basso quelle dei filtri interferenziali con larghezza di banda di 50nm. In entrambi i grafici è mostrata l'irradianza, dell'intera banda visibile dovuta ai filtri dicroici.

Nell'infrarosso è stata stimata un'irradianza di $0,04 \text{ W/m}^2$ nel caso dell'intera banda a $715 < \lambda < 1000 \text{ nm}$ e di $0,01 \text{ W/m}^2$ nel caso del filtro interferenziale a 812 nm .

La quantità di energia luminosa applicata sul campione (in Joule) per la radiazione NIR abbiamo cercato di mantenerla paragonabile a quella riportata in letteratura. Essa è immediatamente ricavabile:

$$E [\text{J}] = P[\text{W}] \times \Delta t [\text{s}]$$

dove E espressa in Joule è l'energia, W (Watt) è la potenza e s (secondi) il tempo.

2.2.2 Elettrodo di Clark.

L'elettrodo di Clark (**Fig. 2.4-A**) è composto da una camera cilindrica cava all'interno della quale si trova la camera di reazione anch'essa cilindrica, termostatabile tramite circolazione di acqua o altro liquido nell'intercapedine tra le due camere. La camera esterna ha quattro finestre laterali attraverso le quali il campione può essere irraggiato.

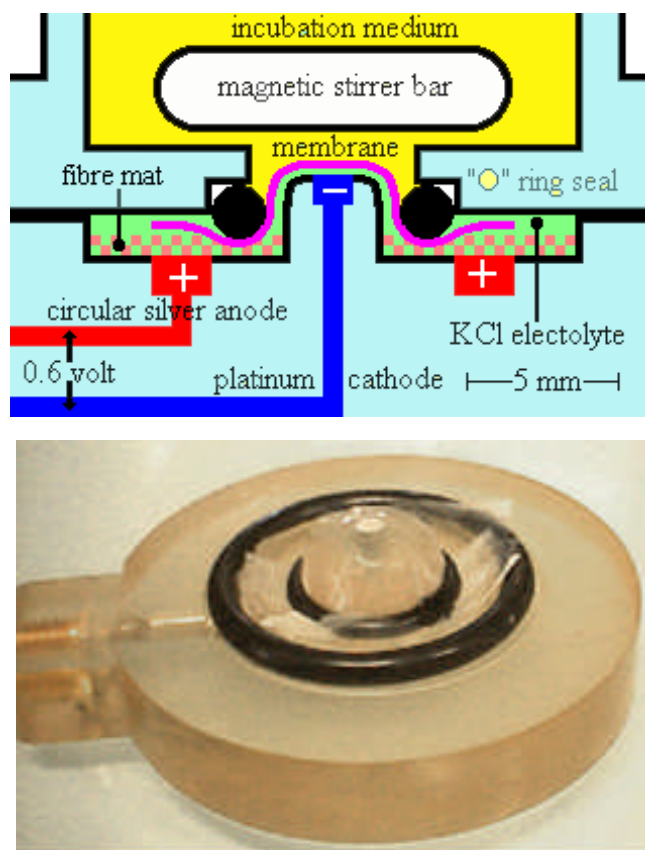
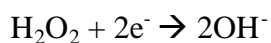
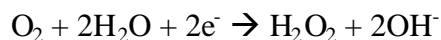


Figura 2.4: Elettrodo di Clark. *A) disegno schematico della camera di reazione. B) foto dell'elettrodo in cui è visibile la membrana di PTFE che permette il passaggio dell' O_2 .*

L'elettrodo vero e proprio (**Fig. 2.4-B**) si trova su un disco che chiude la parte inferiore del cilindro e della camera di reazione, in modo da essere in contatto con la soluzione da analizzare o con la sospensione di cellule. Il catodo di platino è posto al centro di una piccola cupola concentrica con il disco e di diametro uguale a quello della camera di reazione; l'anodo di argento è un filamento circolare posto attorno alla base della cupola. Come conduttore tra i due elettrodi viene usato uno strato sottile di carta imbevuta con KCl a concentrazione pari al 50% della saturazione. Una membrana sottile di teflon o politene (0,0125 mm di spessore) permeabile all'ossigeno separa gli elettrodi dalla soluzione. Un'ancoretta magnetica permette una distribuzione uniforme dell'ossigeno all'interno della camera di reazione. L'ossigeno che diffonde attraverso la

membrana di teflon è ridotto sulla superficie di platino del catodo a perossido di idrogeno (H_2O_2) e a OH^- secondo le seguenti reazioni:



Quattro elettroni vanno dall'anodo al catodo e l'argento, ossidato a cloruro di argento, si deposita sull'anodo:



La corrente che si genera è stechiometricamente correlata alla quantità di ossigeno consumata al catodo, che, a sua volta, è proporzionale alla concentrazione di ossigeno presente nella camera di reazione.

La corrente elettrica generata dalla riduzione dell'ossigeno al catodo è convertita in voltaggio da un apposito strumento (Hansatech CB1-D), collegabile ad una scheda RS232 (Handy Serial Periphall ZE811, HPS ZE811, Zirelco, Svizzera) che permette l'acquisizione *via* computer dei valori misurati dall'elettrodo. Un software mostra durante la misura un grafico temporale dei valori sperimentali acquisiti.

Calibrazione elettrodo di Clark

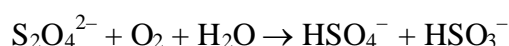
Nella **Tabella 2.1** sono riportati i dati di letteratura per le concentrazioni di O_2 dell'acqua deionizzata saturata con aria in funzione della temperatura.

T (°C)	O_2 (ppm)	O_2 ($\mu\text{mol/L}$)
0	14,16	442
5	12,37	386
10	10,92	341
15	9,76	305
20	8,84	276
25	8,11	253
30	7,52	230
35	7,02	219

Tabella 2.1: *Contenuto in O_2 dell'acqua deionizzata.*

Nelle nostre condizioni di misura, l'acqua saturata con aria a 25°C ha dato in modo consistente letture dell'elettrodo intorno a 960-970 mV. Valori simili si riscontravano quando l'acqua deionizzata era sostituita dal tampone di misura.

Aggiungendo ditionito di sodio a queste soluzioni la misura mostra un calo dapprima repentino, poi via via più lento, man mano che il ditionito reagisce con O₂ secondo l'equazione:



Se il ditionito è in eccesso, la misura raggiunge una lettura stabile detta linea di anossia. Nelle nostre condizioni questa si aggirava sempre tra 10 e 15 mV.

Possiamo quindi ricavare una corrispondenza tra lettura in mV e [O₂].

950 mV corrispondono a [O₂] = 250 μM; poiché i valori sono proporzionali e valgono anche per le variazioni, una differenza di 3,8 mV equivale ad una variazione di [O₂] pari a 1 μM e una differenza di 1 mV corrisponde ad un Δ[O₂] pari a 0,26 μM.

Calcolo della velocità di reazione (consumo di O₂):

$$\Delta[\text{O}_2]/\Delta t = \Delta \text{mV s}^{-1}/3,8 (\mu\text{M s}^{-1})$$

2.3 Inibitori della CcOX

Sono state utilizzate più sostanze a carattere inibitorio nei confronti della CcOX quali il formiato di ammonio (HCOONH₄), sodio azide (NaN₃), cianuro di potassio (KCN). L'inibitore più adatto ai nostri scopi è stata, però, la NaN₃. Per impedire che una diluizione eccessiva del campione dovuta all'aggiunta dell'inibitore alterasse la misura, di questo inibitore veniva preparata una soluzione madre ad alta concentrazione (8 M) da cui si prelevavano aliquote dell'ordine dei μL in base alla percentuale di inibizione da generare nell'attività dell'enzima. Le concentrazioni di NaN₃ utilizzate tipicamente nei nostri esperimenti sono le seguenti: 1, 25, 50, 100, 200, 500, 1000 mM

2.4 Enzima isolato: misure spettrofotometriche e ossigrafiche.

Lo spettro di assorbimento nel visibile ($400 < \lambda < 700$ nm) della CcOX nella forma parzialmente ossidata (a valenza mista) e nella forma completamente ridotta può essere ottenuto attraverso i seguenti passaggi:

- Per misurare la forma parzialmente ossidata si aggiunge una concentrazione nota di CcOX solubilizzato e stabilizzato nel detergente lauril- β -D-maltoside ad un soluzione tampone di HEPES sodico 20 mM, KCl 50 mM, lauril- β -D-maltoside 0,2% a pH 7,4. L'ossigeno disciolto in soluzione è condizione sufficiente affinché l'enzima mantenga la forma parzialmente ossidata.
- Per misurare la forma completamente ridotta, si tratta la suddetta soluzione, contenente la CcOX, con un eccesso di ditionito di sodio puro e anidro, che elimina l'ossigeno dalla soluzione: in questo modo l'enzima assume e mantiene la forma completamente ridotta.

I campioni descritti, tenuti ad un volume di 1-2 ml in semimicrocuvette, vengono quindi misurati con lo spettrofotometro.

Le misure ossigrafiche della CcOX isolata sono effettuate aggiungendo 10 μ l di enzima 200 μ M ($C_f = 25$ nM) ad una miscela così composta: 1890 μ l di soluzione tampone (HEPES sodico 20 mM, KCl 50 mM, lauril- β -D-maltoside 0,2% a pH 7,4), 20 μ l di citocromo *c* ($C_f = 20$ μ M), 80 μ l di mix-riducenti ([ascorbato di potassio] $_f = 20$ μ M, [TMPD] $_f = 200$ μ M). Il mix-riducenti ha la funzione di un sistema red-ox: mantiene il citocromo *c* ridotto in modo che l'enzima possa lavorare in condizioni di stato stazionario.

2.5. Procedura sperimentale

2.5.1. Preparazione dei campioni cellulari

Prima di ogni set di misure per ogni cultura utilizzata, sia di *T. thermophila* che di *S. cerevisiae*, controllavamo la concentrazione cellulare (numero di cellule per millilitro). Le colture venivano successivamente concentrate con una

centrifugazione blanda e il pellet cellulare così ottenuto veniva risospeso con il tampone di saggio.

Il volume del tampone di saggio usato per risospendere le cellule era calcolato tenendo presente che, per le nostre esigenze sperimentali, il volume del campione cellulare doveva essere di circa 200 μ L.

2.5.2 Misura ossigrafica

Per effettuare le misure con l'elettrodo di Clark, dopo aver preparato la cella contenente l'elettrodo propriamente detto e attivato l'apparato di termostatazione a flusso d'acqua, si immetteva nella camera di reazione la soluzione base. Essa è composta da: 1720 μ L di soluzione tampone ; 80 μ L di un "mix-riducenti". Il volume totale nella camera di reazione era quindi di 2 mL.

La soluzione tampone ha pH 7,4 ed è composta da: HEPES sodico 20 mM, KCl 5 mM, NaCl 125 mM e CaCl_2 1 mM.

Il mix-riducenti è una soluzione di ascorbato di potassio 0,5 mM e tetrametil-p-fenilendiammina (TMPD) 5 mM, che permette all'enzima mitocondriale di lavorare in condizioni di stato stazionario.

Dopo aver immesso nella camera di reazione la soluzione base si inizia a acquisire il segnale dell'elettrodo. Quando quest'ultimo è stabile, generalmente dopo qualche decina di secondi, si aggiunge il campione cellulare di cui si misura l'attività metabolica basale. Un esempio di questo tipo di misura ottenuta usando cellule di *T. thermophila* è mostrato nella **Fig. 2.5**.

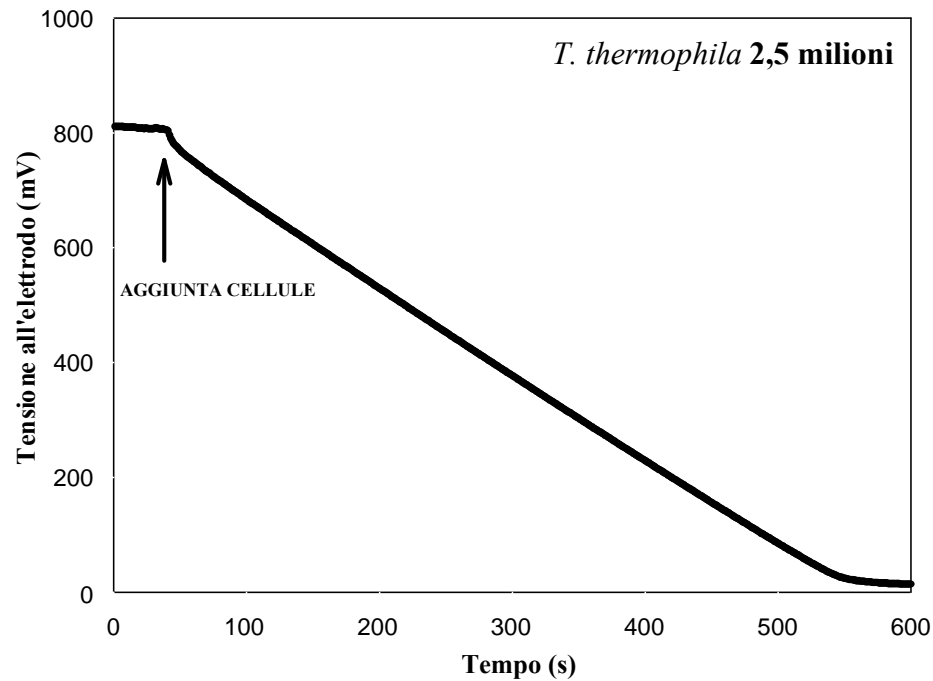


Figura 2.5 Misura con Elettrodo di Clark dell'attività respiratoria di cellule di *T. thermophila*. L'apparato sperimentale registra la misura e consente di seguirla in tempo reale.

Nell'esempio descritto non veniva effettuato nessun tipo di irraggiamento e quindi per tutta la misura la velocità di consumo di ossigeno è un'indicazione della respirazione cellulare basale. Nelle misure con irraggiamento si seguiva la stessa procedura e si registrava anche in questo caso la cinetica basale per circa due o tre minuti al termine dei quali l'apertura di un otturatore dava il via all'irraggiamento. In questo modo era possibile misurare la velocità di consumo dell'ossigeno durante la stimolazione luminosa. La durata dello stimolo era variabile in funzione del tipo di esperimento programmato e poteva durare alcuni minuti o essere mantenuto fino alla fine della misura stessa. Tipicamente una misura nel suo insieme durava circa 15 minuti.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. Misure preliminari per il saggio cellulare all'elettrodo di Clark.

Come descritto nel § 2.5.2 un esperimento tipo comprendeva una prima fase di misura dell'attività basale cellulare e una seconda fase in cui si misurava l'attività durante la stimolazione luminosa. Per una valutazione quantitativa di un eventuale effetto della luce sulla velocità di consumo dell'ossigeno era opportuno che la cinetica misurata si mantenesse lineare in entrambe le fasi. Per questo, per entrambi i tipi cellulari usati, la prima parte del lavoro sperimentale consisteva nella costruzione di una curva di taratura della risposta del nostro elettrodo di Clark in funzione della concentrazione cellulare nella camera di reazione. Questo ci forniva le indicazioni per le concentrazioni cellulari da usare per ottenere cinetiche lineari e di durata adeguata alle misure. La valutazione della linearità delle curve di velocità di consumo di O_2 è stata ottenuta effettuando dei fit di regressione lineare.

Nel caso del ciliato *T. thermophila* abbiamo ritenuto adeguato alle nostre esigenze sperimentali, linearità della cinetica e durata della misura, un numero approssimativo di 2,5-3 milioni di cellule per ogni misurazione (**Fig. 3.1**).

L'aumento della pendenza delle curve all'aumentare del numero di cellule nella camera di reazione indica una proporzionalità diretta tra la velocità di consumo di O_2 e la concentrazione cellulare.

La lieve non linearità delle curve per valori della tensione all'elettrodo inferiore a 200 mV è dovuta alla progressiva diminuzione di O_2 all'interno della camera di reazione e mette in evidenza l'andamento non del tutto lineare sia della respirazione cellulare sia della risposta dell'elettrodo stesso.

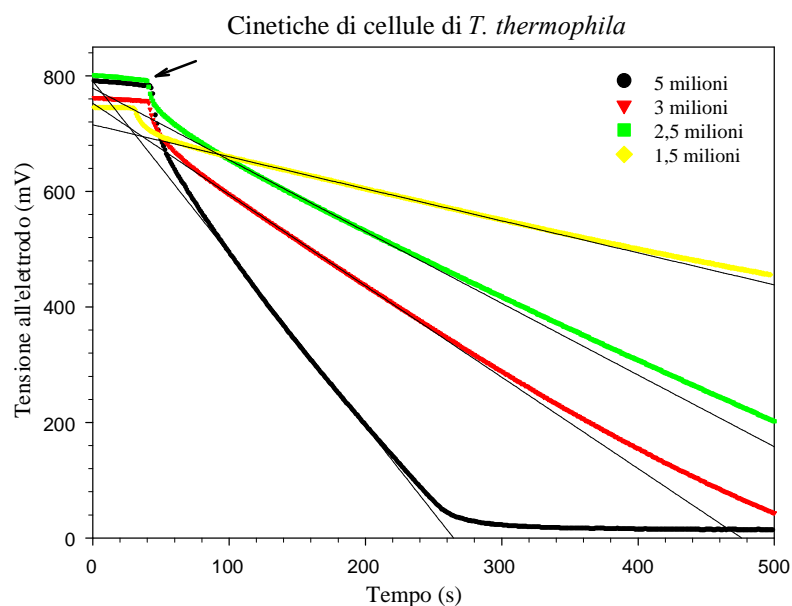


Figura 3.1: Misure ossimetriche dell'attività respiratoria basale di campioni a diversa concentrazione di cellule di *T. thermophila*. Le cellule sono aggiunte dopo 40 s dall'inizio della misurazione (freccia).

Per poter comparare le diverse misure era necessario che le condizioni di crescita delle colture ci consentissero di poter ottenere campioni cellulari che, con buona accuratezza, fossero nella stessa condizione fisiologica e avessero una densità (numero di cellule/volume coltura) adeguata alle esigenze sperimentali. Per questa ragione abbiamo costruito per i nostri campioni cellulari delle curve di crescita (Fig. 3.2) in differenti condizioni di coltura, come ad es. il rapporto superficie-volume per ottenere un'ossigenazione ottimale.

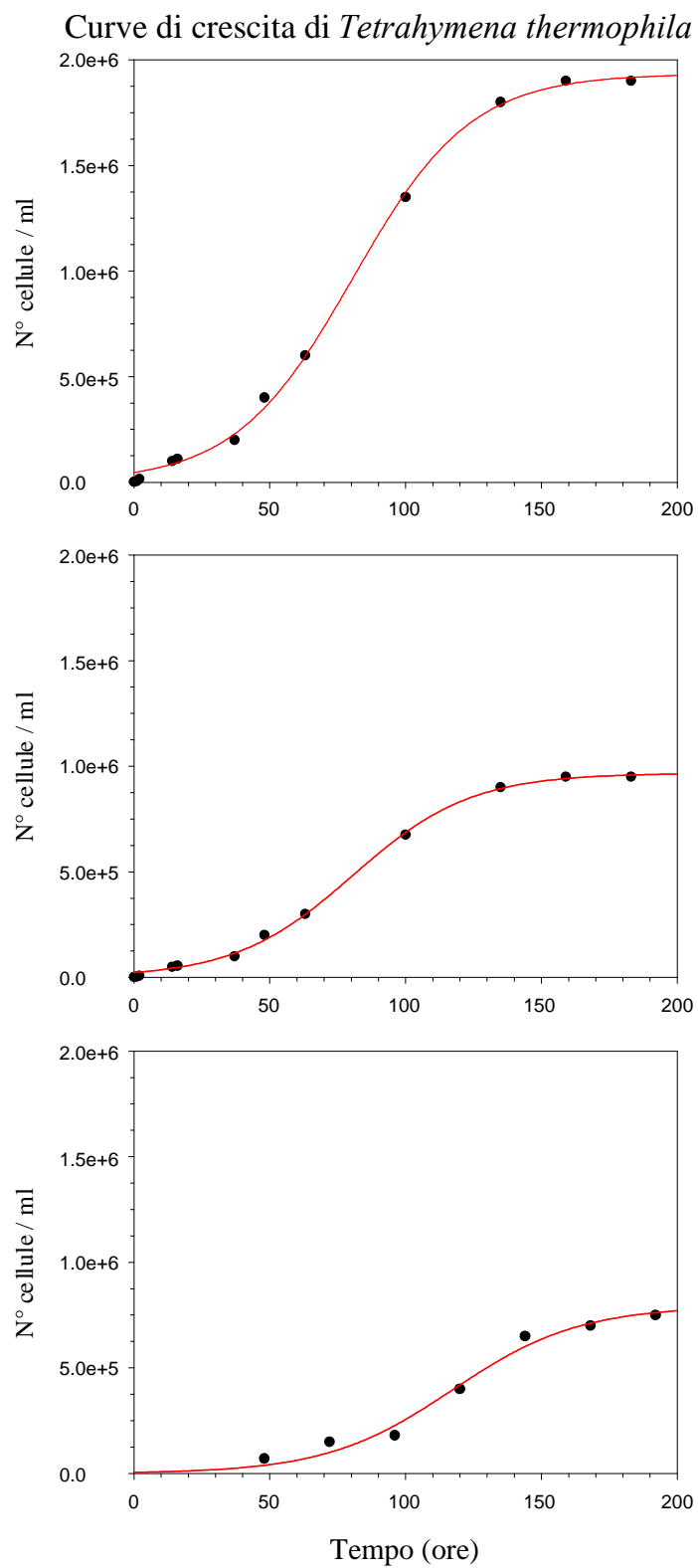


Figura 3.2: Curve di crescita di colture di *T. thermophila* mantenute in differenti condizioni di crescita.

Anche per il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, come per *T. thermophila*, abbiamo dovuto effettuare tutta una serie di misure preliminari per determinare lo stato ottimale di crescita in relazione al tipo di misura da svolgere e per determinare il numero di cellule adeguato alle misure stesse. Considerando la particolarità delle cellule di lievito, le condizioni di crescita e i tipi di terreno di coltura usati in questo caso sono stati molto più numerosi che nel caso delle cellule del ciliato. La **Fig 3.3** mostra le cinetiche di consumo di O_2 di cellule di *S. cerevisiae* cresciute in condizioni di aereobiosi in terreno arricchito di glicerolo.

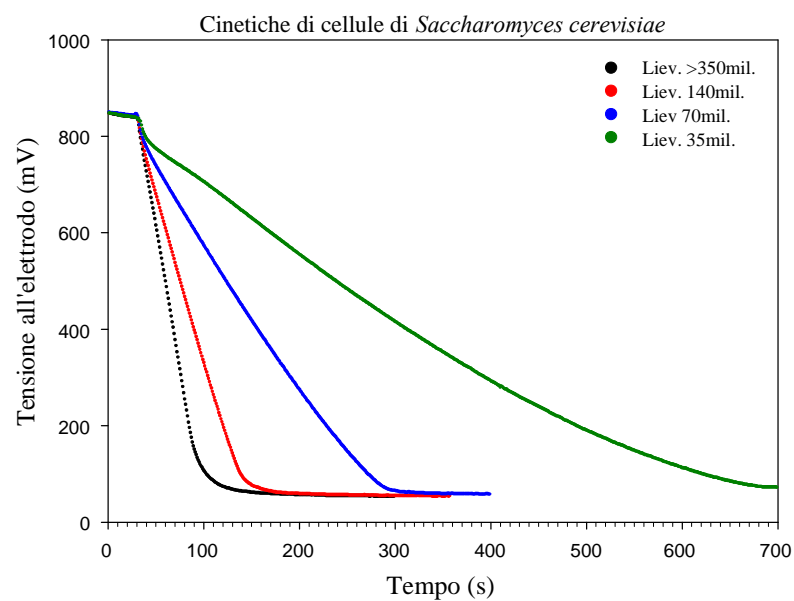


Figura 3.3: Misure ossimetriche dell'attività respiratoria basale di campioni a diversa concentrazione di cellule di *S. cerevisiae*. Le cellule sono aggiunte dopo 40 s dall'inizio della misurazione.

Una prima differenza con le cinetiche misurate con il ciliato è nel numero di cellule adatto a misurare una cinetica respiratoria. Nel caso del lievito aerobiotico, infatti, un numero minimo adeguato per apprezzare un segnale era tra i 10 e i 25 milioni di cellule per misura. Un ordine di grandezza più alto che per il ciliato. Per il lievito cresciuto in condizioni di semi-anaerobiosi in terreno arricchito di glucosio questo numero aumentava notevolmente ed era tra i 60 e 100 milioni.

3.2 Misure della velocità di consumo di O₂ durante irraggiamento con luci di diversa lunghezza d'onda.

3.2.1 *Tetrahymena thermophila*

L'irraggiamento con luce Visibile (390-700 nm) effettuato su cellule di *T. thermophila* durante le misure di respirazione cellulare sopra descritte, induce un aumento immediato e significativo della velocità di consumo di O₂ (Fig. 3.4).

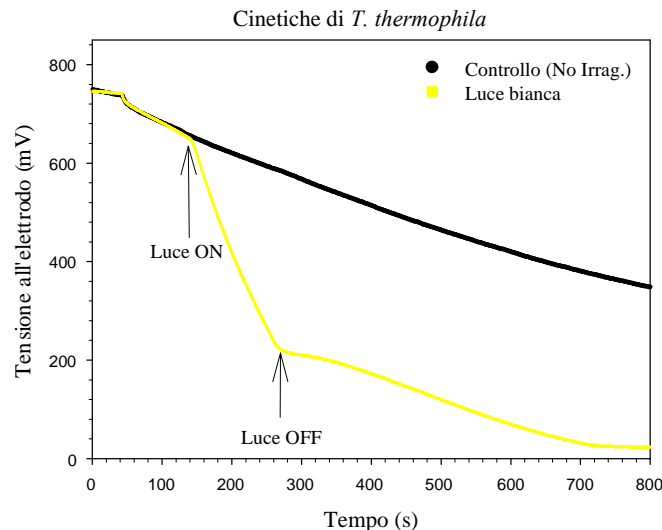


Figura 3.4: Attività respiratoria di cellule di *T. thermophila* al buio (curva nera) e durante l'irraggiamento con luce visibile (curva gialla). E' evidente l'immediatezza con cui la luce induce un aumento dell'attività di consumo di ossigeno. Le cellule misurate sono 2,5 milioni.

L'immediatezza della risposta fotobiologica, solo pochi secondi dopo l'inizio dell'irraggiamento, suggerisce un meccanismo di fotoattivazione legato a molecole già pronte all'uso, cioè che non hanno bisogno di essere sintetizzate ex-novo o attivate da meccanismi di secondo messaggero, e, dal momento che la cinetica di consumo di O₂ misurata con l'elettrodo di Clark è una misura dell'attività respiratoria cellulare cioè dell'attività della catena mitocondriale di trasporto degli elettroni, l'effetto misurato potrebbe essere ascrivibile a una azione diretta della luce su uno o più elementi della catena suddetta. In questa direzione l'enzima che probabilmente potrebbe essere coinvolto è la citocromo c ossidasi, CcOX, che nella catena di trasporto elettronico è quello che direttamente interagisce con l'ossigeno molecolare. Per verificare la validità di questa ipotesi

abbiamo effettuato esperimenti di irraggiamento delle cellule con differenti lunghezze d'onda. Il grafico in **Fig. 3.5** è un esempio della risposta all'irraggiamento con filtri interferenziali band-pass con larghezza di banda di 50 nm. Tutte le bande usate inducono un aumento della velocità di consumo di O₂, ma l'entità di questo aumento è funzione della lunghezza d'onda.

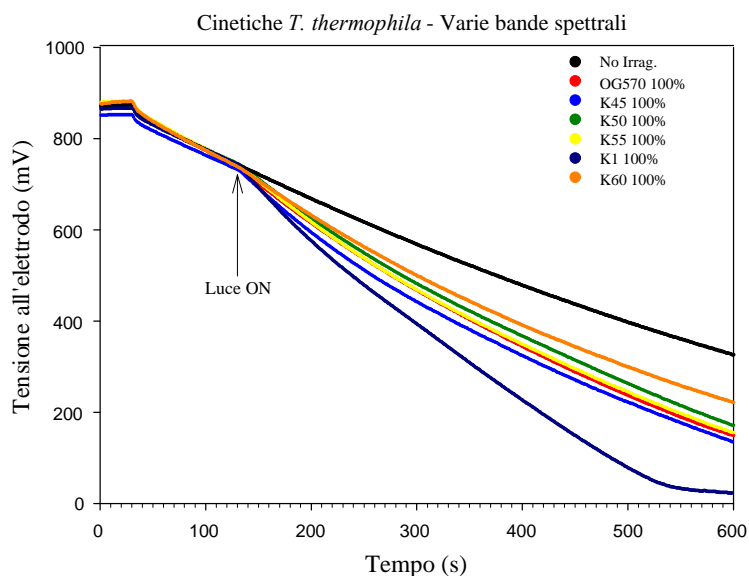


Figura 3.5: Irraggiamenti di cellule di *T. thermophila* con varie bande spettrali dello spettro visibile

Per avere una valutazione quantitativa dell'effetto dell'irraggiamento sul consumo cellulare di ossigeno abbiamo effettuato dei fit di regressione lineare sulla porzione di curva misurata prima dell'accensione della luce e sulla porzione di curva misurata dopo l'accensione della stessa. Successivamente abbiamo calcolato il rapporto, **R**, tra la velocità durante l'irraggiamento (V_{irr}) e la velocità iniziale (V_i), respirazione cellulare in condizioni basali.

$$R = \frac{V_{irr}}{V_i}$$

R è il parametro utilizzato per confrontare l'attività respiratoria cellulare nelle diverse condizioni sperimentali da noi usate. Esso è, ovviamente, pari a 1 nel caso in cui la luce non abbia alcun effetto, è maggiore di 1 se la luce induce un aumento nel consumo di O₂, minore di 1 in caso contrario.

La comparazione dei valori di **R** calcolati per le curve di **Fig. 3.5** e i valori delle irradianze utilizzate per ogni banda spettrale (Tab. 3.1) mette in evidenza, ancor

più del grafico, che la luce più efficace nell'indurre l'aumento di consumo di O₂ è quella blu selezionata con il filtro K1 centrato a 420 nm. Infatti, benchè l'irradianza ottenuta con questo filtro sia la minima tra tutte, la risposta rappresentata dal parametro **R** è massima. L'efficacia di ogni banda nell'indurre la risposta è immediatamente evidente calcolando il rapporto

$$Eff \% = \frac{R}{V_{irr}}$$

tra la risposta **R** e l'irradianza delle diverse bande spettrali (Tab 3.1). In **Fig: 3.6** è riportata una rappresentazione grafica dell'efficacia delle varie bande spettrali utilizzate. Il confronto con lo spettro d'assorbimento della CcOX di cuore bovino a valenza mista indica una discreta sovrapposizione, se si tiene anche conto delle possibili differenze tra enzimi di sistemi biologici così diversi tra loro. Lo spettro di assorbimento della CcOX gentilmente fornitaci dal prof. Sarti dell'Università la Sapienza di Roma, è stato misurato senza agenti riducenti che mantengono l'enzima stabilmente nel suo stato ridotto. In queste condizioni di misura, più simili a quelle cellulari, l'enzima presenta tutti i suoi stati di valenza, stato a valenza mista, con uno spostamento dei picchi di assorbimento verso il blu.

Tabella 3.1 *Risposta **R** all'irraggiamento a varie bande spettrali del Visibile e loro efficacia **Eff**.*

Filtro	Irradianza (W m ⁻²)	R	Eff %
K1	87	2.27	2.62
K45	208	1.88	0.90
K50	211	1.60	0.76
K55	238	1.54	0.64
K60	197	1.28	0.65
OG570	503	1.40	0.28

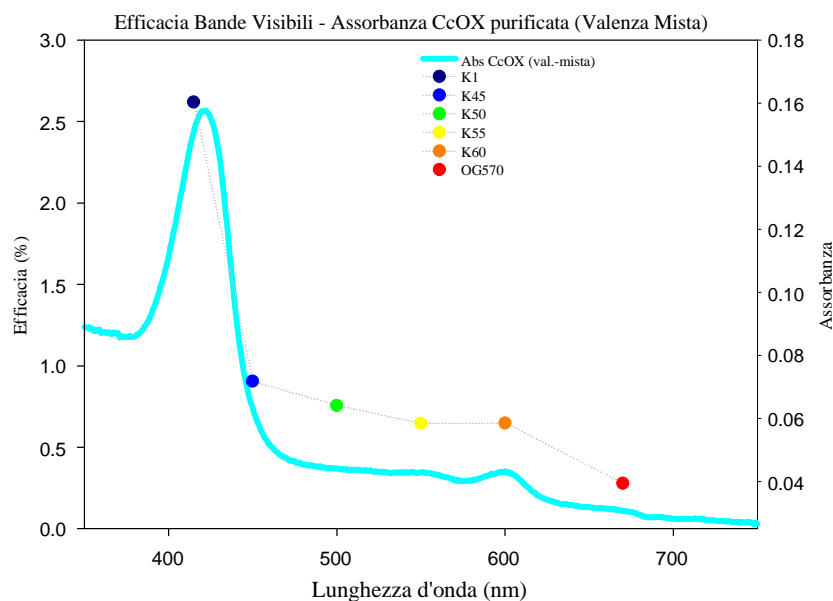


Figura 3.6: *Efficacia delle diverse bande spettrali nell'indurre l'aumento di velocità di consumo di O_2 .*

In tutti gli esperimenti da noi effettuati con diverse bande spettrali dello spettro Visibile la massima efficacia nell'indurre l'aumento della respirazione cellulare era sempre dovuta alla banda blu centrata a 420 nm.

Un aumento della velocità di consumo di O_2 era ottenuto anche con la banda arancio-rossa, cioè con luci di lunghezza d'onda compresa tra 570 nm e 680 nm. La maggiore efficacia della banda arancio selezionata dal filtro K60 centrato a 600 nm rispetto a quella arancio-rossa selezionata con il long-pass OG570 evidenzia che la luce che effettivamente induce l'effetto fotobiologico è quella che copre una banda di spettro visibile di circa 60 nm intorno a 600 nm. In ogni caso l'effetto misurato usando entrambi questi filtri era modesto ma stabile, cioè di entità comparabile nelle diverse misure effettuate. Non altrettanto succedeva con le risposte ottenute con le altre bande da noi usate e comprese tra 450 nm e 570 nm. Questi risultati possono ragionevolmente essere interpretati facendo riferimento agli assorbimenti associati ai vari stati di valenza della CcOX.

Un'ulteriore indicazione sul possibile ruolo di fotoaccettore della CcOX viene dall'analisi delle curve dose-risposta misurate con le bande spettrali del blu e dell'arancio-rosso (**Fig. 3.7**). Esse confermano la maggiore sensibilità del ciliato alla luce blu e il confronto tra le due risposte è paragonabile al rapporto tra i picchi

di assorbimento della CcOX da noi misurati, ma ampiamente riportati anche in letteratura.

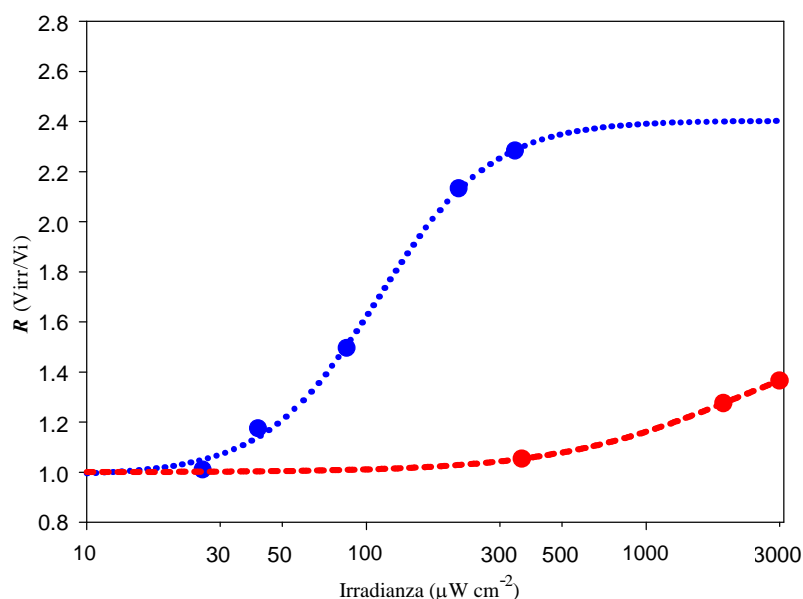


Figura 3.7: Curve dose-risposta ottenute irraggiando cellule di *T. thermophila* con luce blu centrata a 420 nm (K1) e luce arancio-rossa con $\lambda > 570$ nm (OG570).

Le indicazioni provenienti dall'insieme dei risultati sin qui descritti che suggeriscono un coinvolgimento dell'enzima mitocondriale nell'effetto fotobiologico, sono ulteriormente ribadite da analoghe misure effettuate su cellule di lievito.

3.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Come già detto in precedenza la scelta del lievito era stata dettata dalla peculiare caratteristica di questo eucariota di essere un aerobio facoltativo in grado di modulare il suo metabolismo e il grado di espressione di alcuni enzimi come la CcOX in funzione delle condizioni di crescita.

La risposta all'irraggiamento del lievito cresciuto in condizioni di aerobiosi era molto simile a quella di *T. thermophila*. Anche qui si otteneva un aumento della attività respiratoria che come per il ciliato era dipendente dalla banda spettrale (Fig. 3.8).

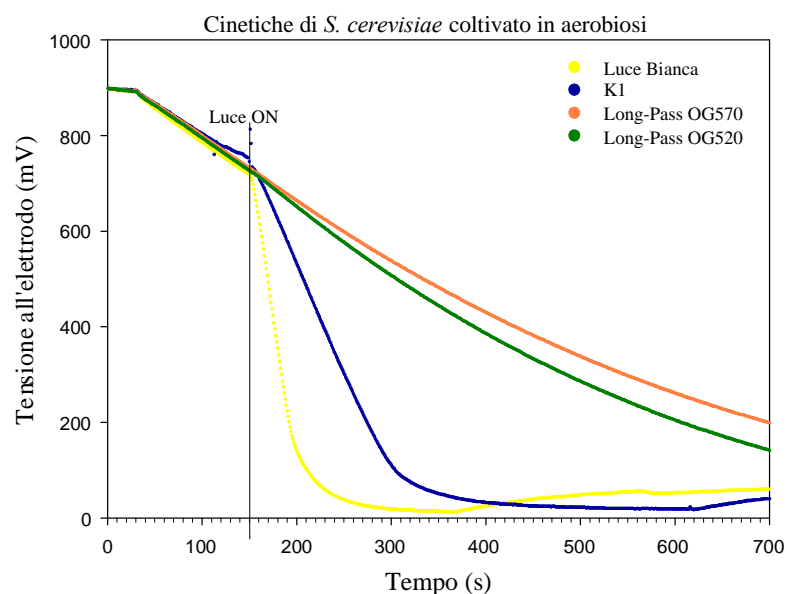


Figura 3.8: Cinetiche di *S. cerevisiae* irraggiato con diverse bande spettrali. Numero di cellule per misura 2,5 milioni.

Inoltre, la banda più efficace era centrata nel blu a 420 nm (**Fig. 3.8**) e a questa luce *S. cerevisiae* mostrava una buona sensibilità come si evidenzia dal grafico in **Fig. 3.9** in cui si vede che anche con un'irradianza di circa il 10% del totale si ottiene un effetto, seppur molto limitato.

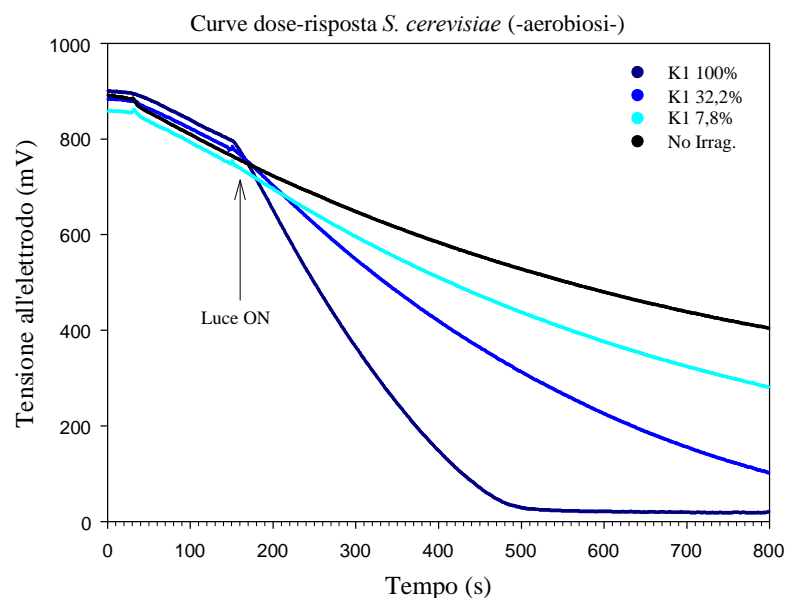


Figura 3.9: Curve dose-risposta di *S. cerevisiae* irraggiato con differenti irradianze di luce blu, centrata a 420 nm (filtro K1, 52 W/m²). Numero di cellule 25 milioni.

Totalmente diversa si presentava la situazione quando lo stesso *S. cerevisiae* veniva cresciuto in condizioni di semi-anaerobiosi. Una prima differenza sperimentale, come già detto, era dovuta al numero di cellule per misura atte a ottenere una ragionevole cinetica di consumo di O_2 , che in questo caso era di circa 100 milioni di cellule. Una conferma, questa, della limitatissima capacità respiratoria del lievito semi-anaerobio. La seconda e più rilevante differenza era che l'aumento di velocità nel consumo di O_2 era decisamente trascurabile anche quando la luce di stimolazione era l'intera banda spettrale visibile, luce bianca (Fig. 3.10).

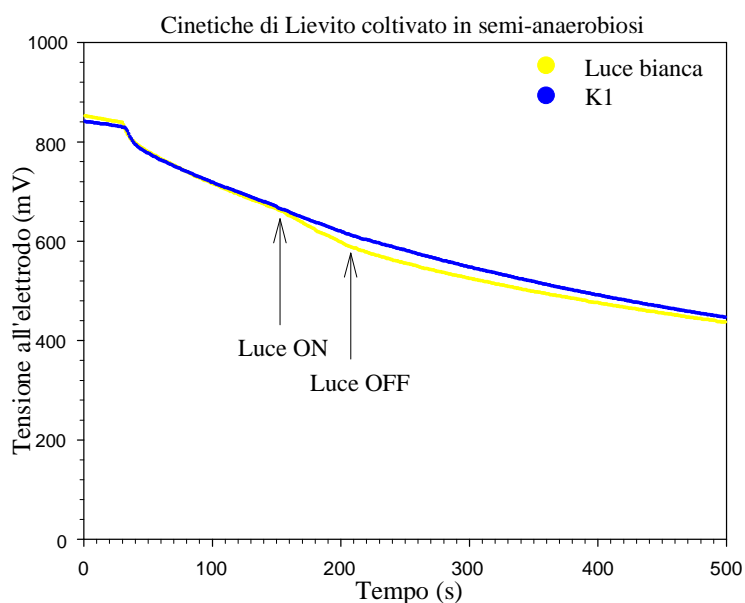


Figura 3.10: Effetto della luce su cellule di lievito cresciute in condizioni di semi-anaerobiosi. Un effetto trascurabile si ottiene con l'intera banda spettrale visibile. Luce bianca $3 \times 10^3 \text{ W/m}^2$, Luce blu (K1) 52 W/m^2 . Numero di cellule 100 milioni.

In questa stessa direzione vanno le analoghe misure condotte su cellule del ceppo mutato Del_COX12 di *S. cerevisiae*. Questo ceppo ha subito una delezione a livello della subunità regolatoria VI della CcOX. La mutazione rende l'enzima non funzionante tanto che le sue colture non sono in grado di svilupparsi bene in condizioni di aerobiosi. Questo ci ha posto alcune difficoltà nella pianificazione degli esperimenti che prevedeva di effettuare misure di controllo sul ceppo non mutato. Ovviamente, come verificato in precedenza, per valutare l'effetto della luce sul ceppo selvatico era necessario farlo sviluppare in condizioni di aerobiosi,

che andavano mantenute anche per il ceppo mutato. Dopo varie misure preliminari siamo riusciti a ottenere una condizione ragionevole per avere una buona crescita di entrambi i ceppi.

La risposta misurata nel ceppo Del_COX12 è molto simile a quella delle cellule del più comune ceppo di *S. cerevisiae* che sono state già descritte. La luce, anche quella bianca, non ha alcun effetto significativo sull'attività di consumo cellulare di ossigeno, mentre il ceppo selvatico di controllo mostrava una buona risposta fotobiologica (**Fig. 3.11**).

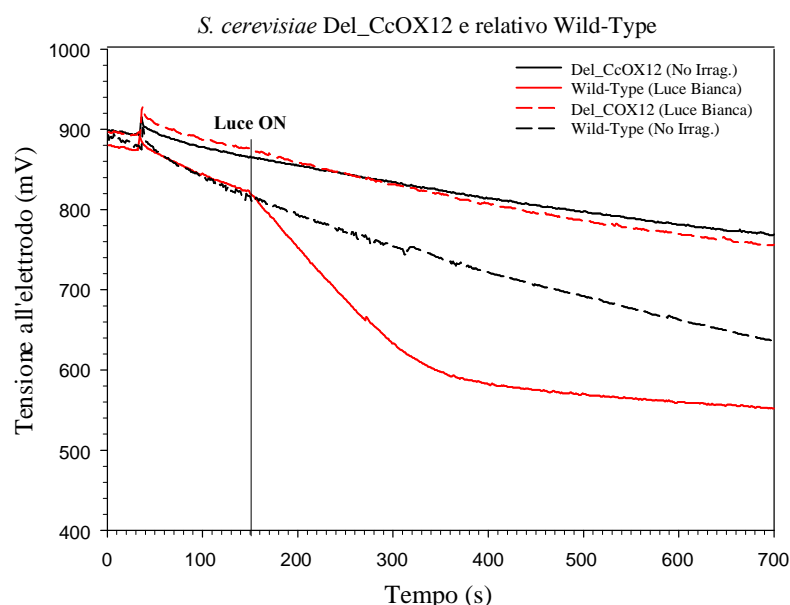


Figura 3.11: Attività respiratoria basale del mutante di *S. cerevisiae* Del_COX12 e del relativo ceppo selvatico (Curve nere). Attività respiratoria degli stessi ceppi durante l'irraggiamento (Curve rosse). Il numero di cellule per misura 100 milioni.

L'insieme dei risultati sperimentali sin qui descritti su cellule di *T. thermophila* e di *S. cerevisiae* suggeriscono un coinvolgimento diretto della citocromo c ossidasi nell'aumento della velocità di consumo di O_2 indotto dalla stimolazione luminosa, ma non danno indicazioni sul meccanismo d'azione della luce. Nell'intento di comprendere questo meccanismo abbiamo studiato la risposta cellulare in presenza di specifici inibitori dell'enzima.

3.3 Meccanismo d'azione: misure con inibitori e con impulsi di luce ripetuti.

La sodio azide (NaN_3), che si è rivelato il composto più adatto nelle nostre condizioni sperimentali, è un noto inibitore della CcOX che si lega a qualunque stato redox dell'enzima e può essere considerata un inibitore competitivo dell'ossigeno molecolare.

Le concentrazioni NaN_3 usate sono state adottate in modo da non arrivare mai ad un'inattivazione totale dell'attività respiratoria, con lo scopo di misurare risposte vitali, che simulino sempre la realtà fisiologica delle cellule cercando di capirne il meccanismo e ottenere un buon modello che simuli il più possibile ciò che avviene in natura, in ambienti acquosi piuttosto ristretti, dove la presenza di cataboliti o scarti del metabolismo o sostanze tossiche disciolte possono in qualche modo influenzare il sistema cellula-ambiente.

Uno dei prodotti intermedi dell'attività catalitica dell'enzima è lo ione perossido O_2^{2-} e, quando l'attività dell'enzima è elevata, questo ione può rimanere in soluzione. Siccome gli esperimenti con inibitori della CcOX riducono bruscamente l'attività dell'enzima e quindi si può avere produzione di ione perossido abbiamo aggiunto al tampone di saggio alcune unità di catalasi per evitare che la produzione di perossidi alterasse le misure. Abbiamo effettuato varie misure di controllo per verificare che la respirazione cellulare non fosse alterata dall'aggiunta della catalasi. Verificato ciò, abbiamo effettuato le misure con NaN_3 che sono state condotte utilizzando luce blu come stimolo luminoso, perché era quella con effetto massimo. E' stato, inoltre, tenuto conto della diminuzione della concentrazione di ossigeno durante la misura e della diversità di questa riduzione in condizioni di illuminazione rispetto alle condizioni di controllo. Per questa ragione tutte le aggiunte di sodio azide nelle misure di controllo sono state effettuate allo stesso valore di potenziale dell'elettrodo a cui venivano effettuate durante l'irraggiamento.

NaN_3 alle concentrazioni da noi usate inibisce l'attività respiratoria cellulare sia nel caso in cui le cellule non sono sottoposte a irraggiamento, sia quando questo è presente (**Fig. 3.12**). Il grado di inibizione, come era prevedibile, è funzione della concentrazione di inibitore (**Fig. 3.13**), però, non è equivalente nei due casi.

L'inibizione in presenza di luce è minore che in sua assenza, in Tabella 3.2 essa è rappresentata dal rapporto

$$R_{\text{azd}} = \frac{V_{\text{azd}}}{V_{\text{irr}}}$$

sulla base del quale abbiamo effettuato tutte le nostre analisi dei dati.

V_{irr} è il valore ricavato da fit lineare della pendenza della curva durante irraggiamento. Il valore del fit per la medesima porzione di curva nelle misure di controllo al buio è ugualmente denominato V_{irr} in Tabella 3.2.

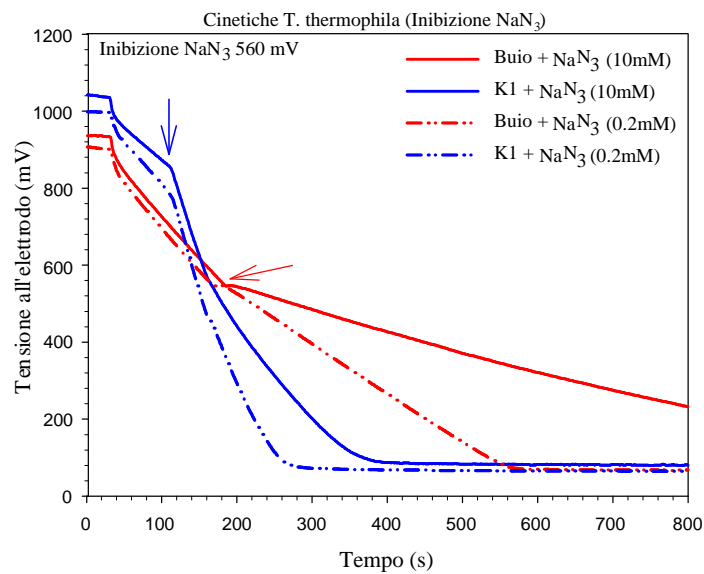


Figura 3.12: Confronto tra cinetiche di *T. thermophila* ottenute con o senza stimolazione con luce blu e in presenza dell'inibitore NaN_3 a due diverse concentrazioni. Irradianza luce blu 52 W/m^2 .

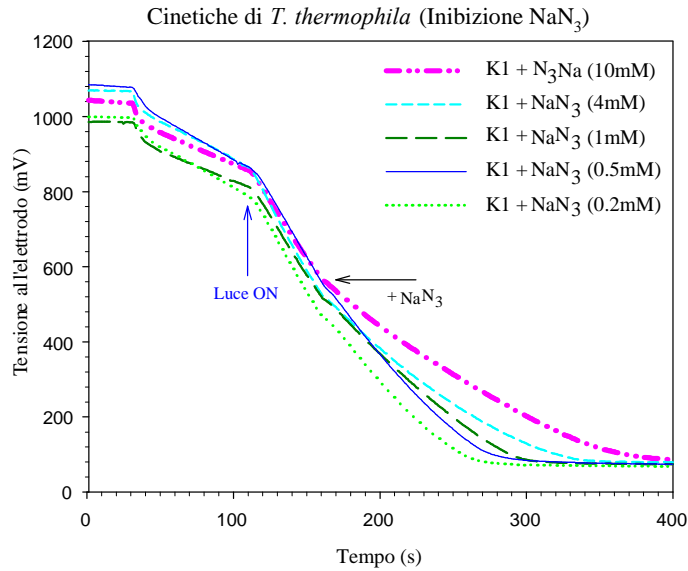


Figura 3.13: Cinetiche di attività respiratoria di cellule di *T. thermophila* in presenza di luce blu (52 W/m^2) e NaN_3 a differenti concentrazioni.

La minore inibizione in presenza di luce sembrerebbe essere più consistente alle alte concentrazioni di NaN_3 . Infatti, i valori del rapporto R_{azd} sono diversi a 10 mM di sodio azide (al buio 0.35, con luce blu 0.52); mentre sono praticamente identici sino a concentrazioni di inibitore di circa 1 mM.

Tabella 3.2: V_i , V_{irr} , V_{azd} sono medie delle velocità di consumo di O_2 calcolate su diverse misure effettuate in campioni con NaN_3 . V_i = velocità basale; V_{irr} = velocità durante irraggiamento; V_{azd} = velocità dopo aggiunta di NaN_3

Filtro	$[\text{NaN}_3]$ mM	V_i	Err. V_i	V_{irr}	Err. V_{irr}	V_{azd}	Err. V_{azd}	$R = V_{\text{irr}}/V_i$	Err. R	V_{azd}/V_i	Err. V_{azd}/V_i	$R_{\text{azd}} = V_{\text{azd}}/V_{\text{irr}}$	Err. R_{azd}
K1	10	-2.13	0.39	-4.93	1.04	-2.53	0.35	2.38	0.39	1.22	0.32	0.52	0.35
K1	4	-2.53	0.30	-4.57	0.37	-2.59	0.19	1.83	0.20	1.05	0.19	0.57	0.15
K1	1	-2.33	0.56	-4.59	0.46	-2.81	0.23	2.09	0.34	1.27	0.32	0.61	0.18
K1	0.5	-2.17	0.66	-4.16	0.26	-2.85	0.12	2.08	0.37	1.43	0.35	0.69	0.1
K1	0.2	-2.46	0.51	-4.21	0.21	-2.86	0.05	1.81	0.26	1.22	0.22	0.68	0.07
buio	0	-1.77	0.30	-1.77	0.33	-1.68	0.35	1.00	0.36	0.95	0.38	0.95	0.4
buio	10	-2.61	0.31	-2.10	0.23	-0.74	0.29	0.81	0.23	0.28	0.51	0.35	0.5
buio	1	-2.48	0.50	-1.90	0.43	-1.21	0.39	0.76	0.43	0.48	0.52	0.63	0.54
buio	0.2	-2.44	0.57	-1.96	0.47	-1.36	0.52	0.80	0.48	0.54	0.61	0.67	0.62

Sono state effettuate misure analoghe anche sul lievito, cresciuto ovviamente in aerobiosi. Similmente alla risposta del ciliato, l'azione della luce nel lievito è una riduzione della capacità inibitoria di NaN_3 . Un esempio di questo tipo di risposta in lievito è riportato nel grafico di **Fig. 3.14** in cui l'inibizione dell'azide è molto limitata.

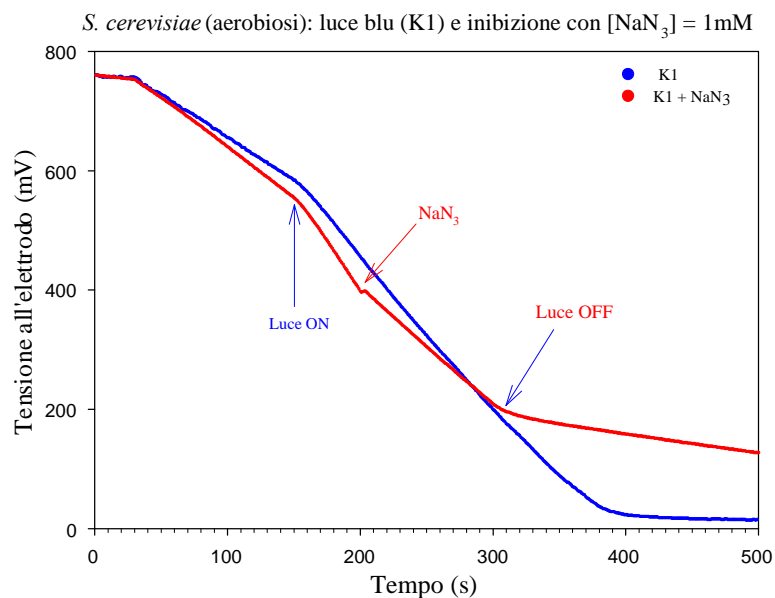


Figura 3.14: Cinetiche di consumo di O_2 di *S. cerevisiae* in presenza di NaN_3 (1 mM) e luce blu (52 W/m^2). L'inibitore è aggiunto a irraggiamento in corso (curva rossa). La pendenza della dopo lo spegnimento della luce è indicativa della reale inibizione di NaN_3 .

L'influenza della luce sulla capacità inibitoria di N_3Na si ottiene sia nel caso in cui l'inibitore sia aggiunto dopo l'inizio dell'irraggiamento sia nel caso inverso, cioè quando l'inibitore è già presente al momento dell'accensione della luce. L'efficacia della luce nel ridurre la capacità inibitoria di N_3Na sembrerebbe diversa nei due casi (**Fig. 3.15**). Situazione simile si riscontra misurando l'attività della CcOX purificata. Benchè la luce non abbia alcun effetto sull'enzima isolato (Remedi A., 2005 Tesi di Laurea), in presenza di NaN_3 si misura una lieve riduzione dell'inibizione sia se l'inibitore è aggiunto a irraggiamento in corso sia quando la luce è accesa in presenza dell'inibitore (**Fig. 3.16**).

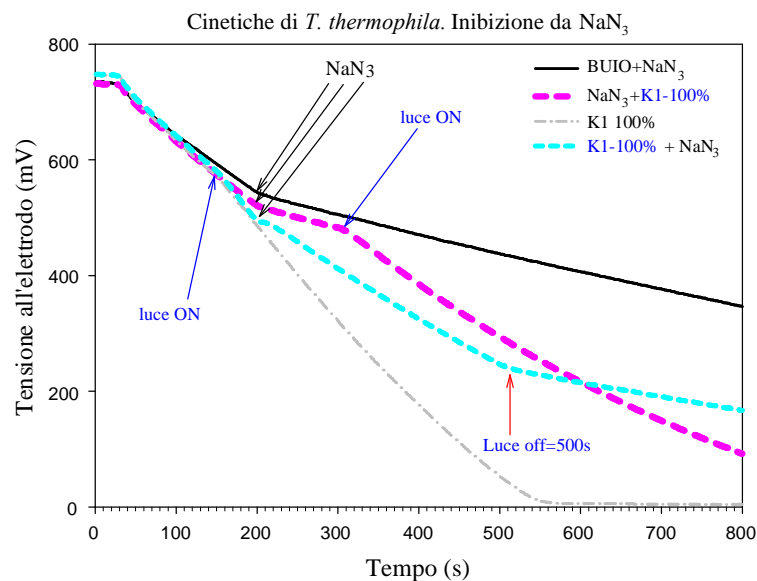


Figura 3.15: Cinetiche di attività respiratoria di cellule di *T. thermophila* in presenza di NaN_3 e luce blu (52 W/m^2). Le frecce blu indicano l'inizio dell'irraggiamento, quelle nere l'aggiunta di NaN_3 .

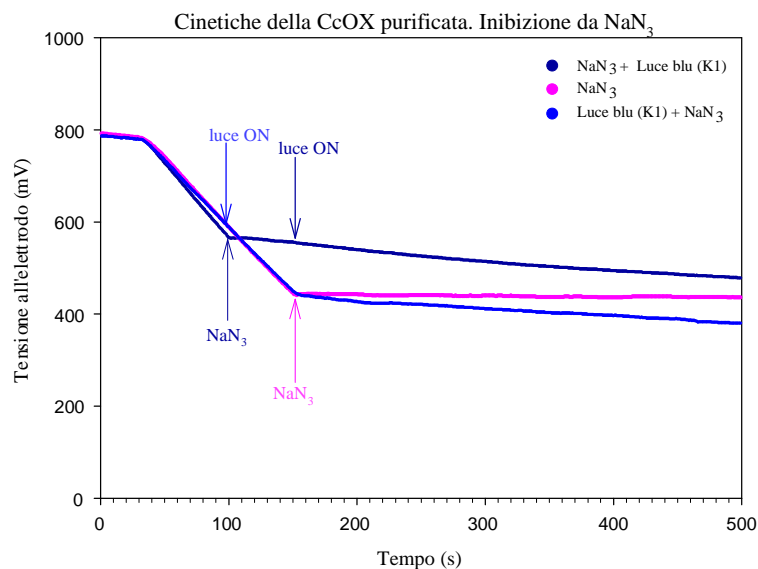


Figura 3.16: Cinetiche di consumo di O_2 della CcOX purificata in presenza di NaN_3 e luce blu (52 W/m^2). L'inibitore è aggiunto a irraggiamento in corso (curva azzurra) o prima che sia accesa la luce (curva blu scuro).

Dai risultati ottenuti non si può trarre una indicazione univoca sul meccanismo d'azione della luce. Non può essere completamente esclusa una reazione di dissociazione fotolitica similmente a ciò che è descritto in letteratura per il

monossido di azoto, NO, sia per l'enzima purificato che per le cellule preventivamente sottoposte a saturazione con NO. D'altra parte non può essere neanche completamente esclusa la possibilità di una variazione dell'affinità dell'enzima nei confronti dell'inibitore. Nella stessa direzione conducono le misure effettuate con impulsi di luce lunghi (60 secondi) ripetuti nel corso della misura ossigrafica (**Fig. 3.17**). Come già evidenziato la variazione di velocità è repentina, ma anche il ritorno alla velocità basale allo spegnimento della luce è abbastanza veloce, pochi secondi, indicando che la luce non promuove un meccanismo biochimico che perdura anche al cessare dello stimolo.

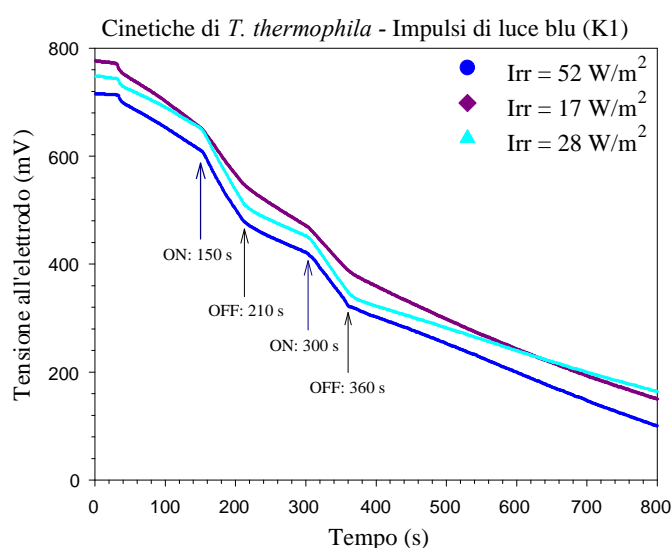


Figura 3.17: Risposta delle cellule di *T. thermophila* ad accensioni ripetute della luce blu effettuate a diverse irradianze.

Inoltre, le cinetiche mostrate in **Fig. 3.17** indicano che il fotoaccettore non viene consumato durante il periodo di irraggiamento. Infatti, se così fosse la variazione di velocità dovuta alla seconda stimolazione luminosa dovrebbe essere minore rispetto alla prima, effetto che non abbiamo mai riscontrato in tutte le misure con stimolazione ripetuta che abbiamo effettuato. In tutte le nostre misure questa invarianza nell'entità dell'aumento di velocità è risultata essere indipendente sia dall'irradianza che dalla banda spettrale utilizzata.

Essendo la citocromo c ossidasi un enzima fondamentale per la fisiologia cellulare con un complesso sistema di regolazione della sua attività (vedi Introduzione), è di notevole interesse comprendere il ruolo fisiologico della foto-modulazione da

noi misurata, qualunque ne sia il meccanismo alla base. Questo è di particolare rilievo se si pensa a microorganismi che vivono in ambienti naturali esposti alla luce solare. Alcune osservazioni fatte durante il corso del lavoro sin qui descritto ci hanno indotto a approfondire lo studio di questo effetto fotobiologico nelle diverse fasi della crescita delle colture.

3.4 Curve dose-risposta in funzione dell'età della coltura.

Per capire se c'era una relazione tra l'età della coltura e l'aumento della respirazione cellulare indotto dalla luce abbiamo effettuato, in prima istanza, delle misure usando l'intera banda Visibile. Abbiamo così verificato che c'è un incremento considerevole della risposta alla luce con l'avanzare dell'invecchiamento della coltura (**Fig. 3.19**).

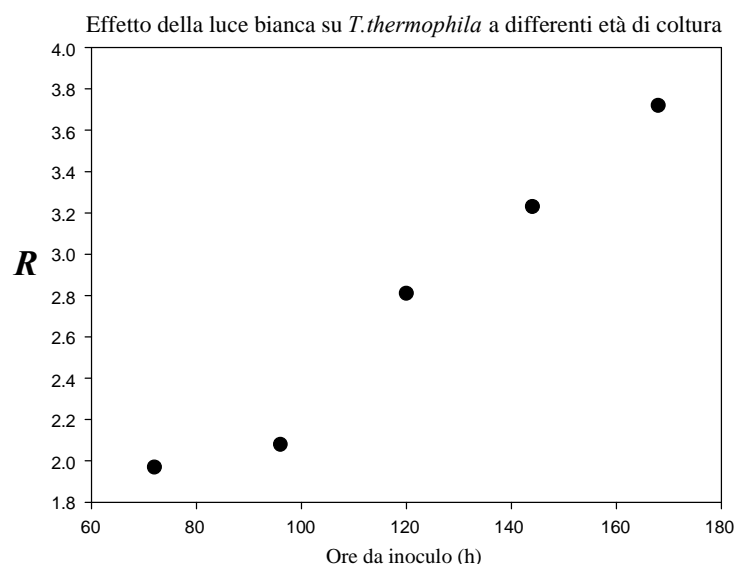


Figura 3.19: *Effetto della banda Visibile lungo la curva di crescita. Il numero di cellule per misura era mantenuto costante.*

Per verificare se anche in questo caso fosse coinvolta direttamente la CcOX abbiamo, quindi, misurato lungo la curva di crescita la risposta a varie bande spettrali. I risultati ottenuti indicano che il fenomeno fotobiologico nella sua tipicità si mantiene indipendentemente dall'età della coltura, quello che varia è l'entità dello stesso (**Fig.3.20**).

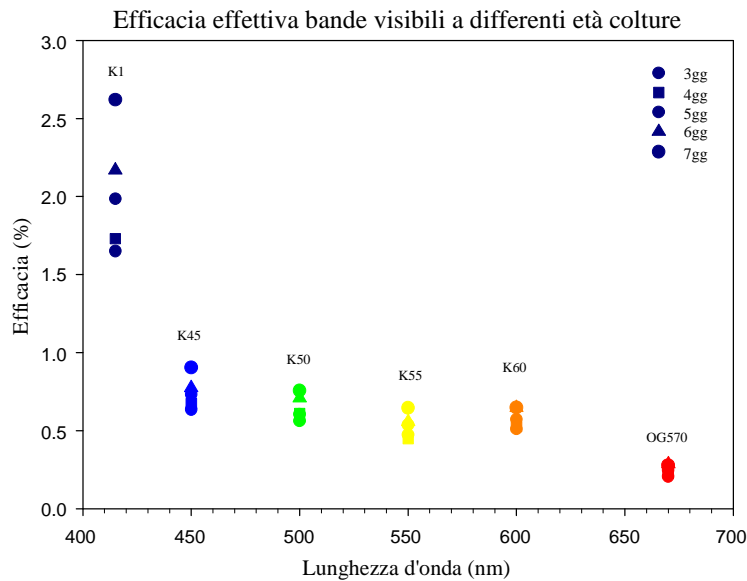


Figura 3.20: *Efficacia (Eff%) delle diverse bande spettrali alle diverse età della coltura. Le sigle indicano i vari filtri usati per selezionare la luce.*

E' da porre in rilievo che nelle diverse fasi di crescita cambia anche la velocità di respirazione basale, che è molto più elevata nella prima fase logaritmica diminuendo man mano che si raggiunge la fase stazionaria (**Fig. 3.21**). L'ampiezza della risposta alla luce cambia anch'essa secondo una proporzionalità inversa, cioè la risposta è minore nella fase logaritmica e diventa massima nella prima fase stazionaria (**Fig. 3.21**).

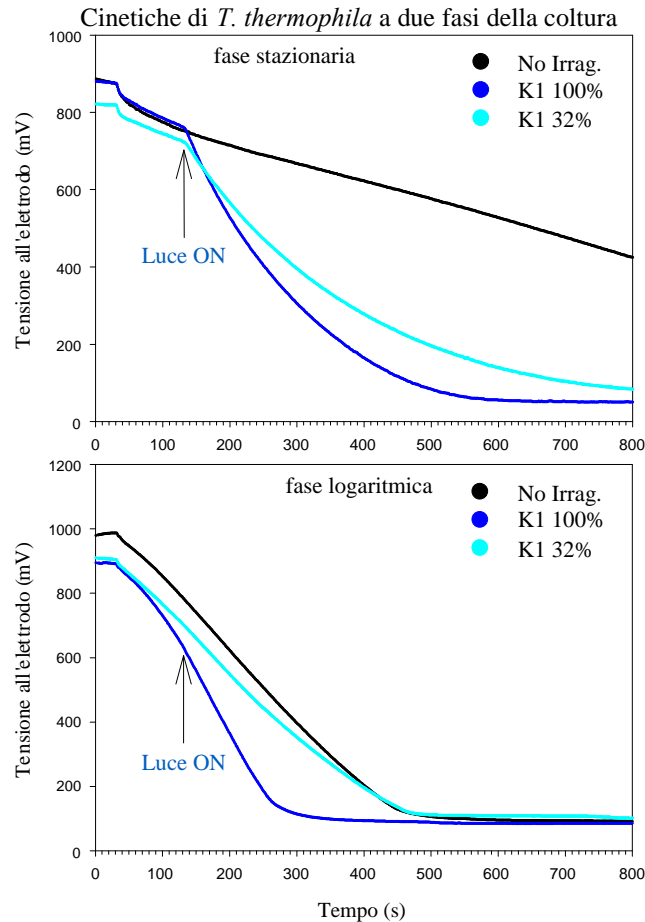


Figura 3.21: Cinetiche di *T. thermophila* in fase stazionaria e logaritmica. Si noti la diversa velocità di respirazione basale e la diversa ampiezza di risposta alla luce.

Sembrerebbe, quindi, che l'aumento di consumo di O_2 dovuto all'irraggiamento sia dipendente dalla fase di crescita delle colture. Per comprendere meglio il meccanismo fisiologico che produce questo fenomeno abbiamo costruito curve dose-risposta con colture mantenute in diverse condizioni e che presentavano differenti andamenti delle curve di crescita. Le curve dose-risposta in **Fig. 3.22** e sono state costruite con colture con andamenti di crescita equivalenti a quelle di **Fig. 3.2** (in alto), mentre per quelle di **Fig. 3.23** sono state usate colture equivalenti a quelle di **Fig. 3.2** (in basso). Entrambi i set di curve dose-risposta mostrano un aumento della risposta stessa con l'età della coltura, e in entrambe il rapporto tra curva ottenuta con la luce blu e quella ottenuta con la luce arancio-

rossa si mantiene simile a quello dei picchi della CcOX, come descritto precedentemente.

Il confronto tra i valori dell'irradianza che induce il 50% della risposta (*b*) estrapolati dai fit di 7 e 5 giorni per le curve dose-risposta di **Fig. 3.22** con gli stessi valori ottenuti dalle curve di **Fig. 3.23** evidenzia che per le prime vi è una maggiore differenza tra le risposte ottenute con cellule in fase logaritmica e quelle della fase stazionaria.

Età coltura (giorni)	Valori di <i>b</i> (Fig.3.22)	Valori di <i>b</i> (Fig.3.23)
7	37.3	46.3
5	23.2	44.4

Questo se comparato con le curve di crescita suggerirebbe che l'effetto della stimolazione luminosa sia da mettere in relazione all'andamento della curva di crescita, piuttosto che alla fase della stessa.

Curve dose-effetto di *T. thermophila* durante le diverse fasi di crescita

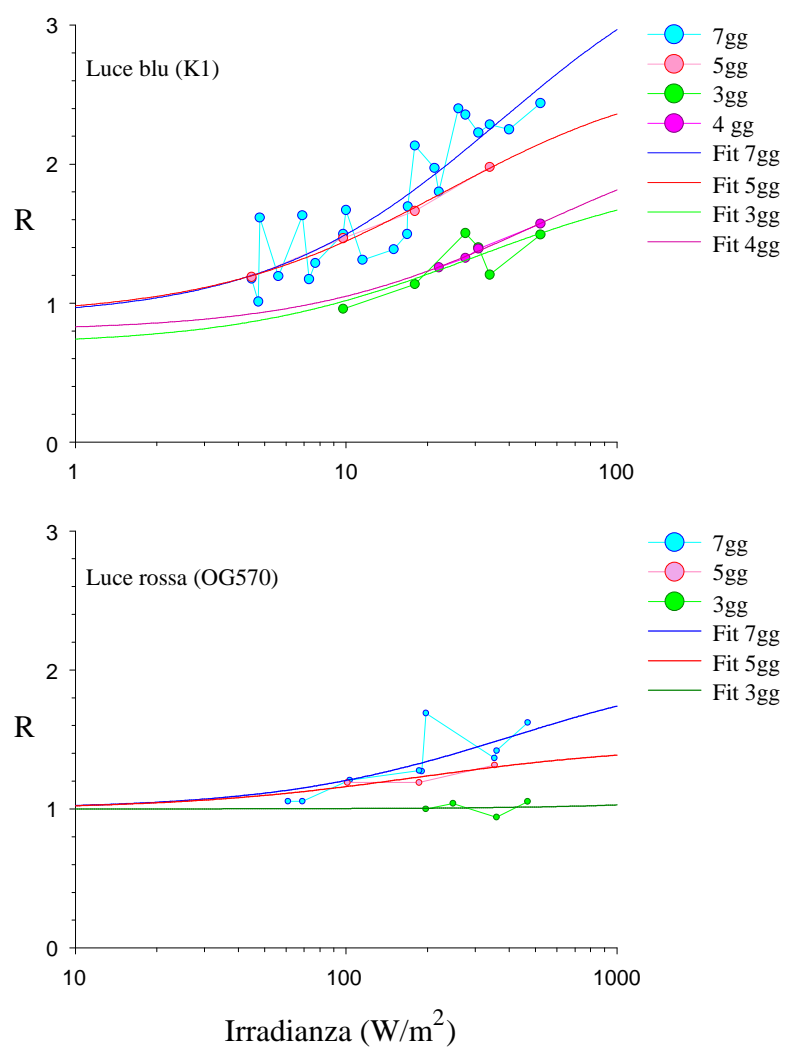


Figura 3.22: Curve Dose-Risposta lungo le fasi di crescita di colture di *T. thermophila* con andamento equivalente a quello riportato in **Fig. 3.2** (in alto)

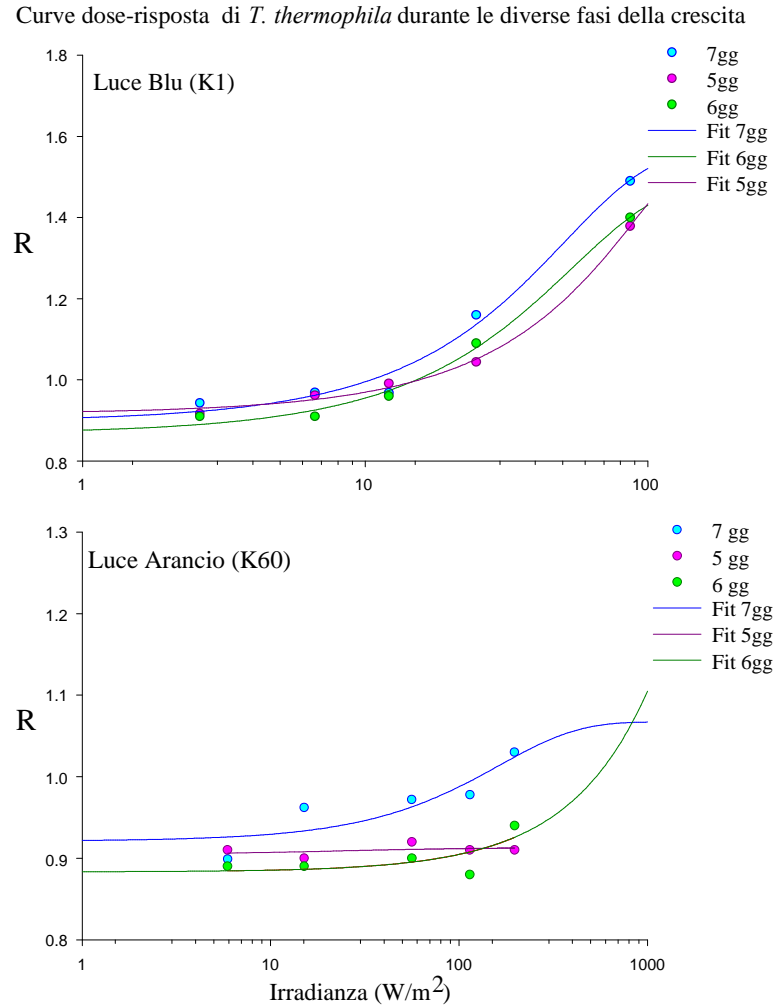


Figura 3.23: Curve Dose-Risposta lungo le fasi di crescita di colture di *T. thermophila* con andamento equivalente a quello riportato in Fig. 3.2 (in basso)

Dall'analisi di questi risultati sembrerebbe, quindi, che l'effetto fotobiologico da noi studiato sia legato allo stato metabolico delle cellule esaminate.

4. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Ipotizzare meccanismi fisiologico-biochimici che possano spiegare i risultati ora esposti, legandoli all'attività della citocromo *c* ossidasi, che risulta comunque coinvolta, non è possibile allo stato delle nostre indagini. Soprattutto pensando all'insieme dei fattori regolatori dell'attività di questo enzima, non ultimo lo stesso ATP che è il prodotto finale della fosforilazione ossidativa (vedi Introduzione). I nostri esperimenti sulle variazioni del contenuto in ATP durante l'irraggiamento delle cellule sono ancora troppo preliminari per dare qualche indicazione.

Indubbiamente la luce modula la respirazione cellulare e l'ampiezza di questa modulazione è dipendente dallo stato fisiologico della cellula stessa. Visto che noi abbiamo cercato di effettuare misure con irradianze il più vicino possibile a quelle naturali, si può ragionevolmente pensare che questo effetto di fotomodulazione sia presente anche in natura e che possa influire sugli equilibri ecologici.

RINGRAZIAMENTI

Penso che non abbia molto senso fare la solita “lista della spesa” ringraziando genitori, fidanzate, amici, compagni di sbronze, collaboratori eccetera.

In questi tre anni di dottorato sono accadute molte cose nella mia vita, alcune positive, altre un po’ meno, ma tutte parimenti significative. E se tornassi indietro non cambierei nulla, rifarei tutto nello stesso modo.

Sono tante le persone che hanno ruotato intorno alla mia vita durante questo non breve percorso di formazione e che, anche solo con un sorriso, mi hanno sostenuto e dato la forza di non cedere e guardare avanti, per raggiungere l’obiettivo.

Quindi una cosa è certa: farei molto prima ad elencare coloro che non hanno creduto in me, piuttosto che quelli che ci hanno creduto!

Io porterò comunque tutti con me, quelli che ci sono e quelli che non ci sono più, quelli che mi hanno aiutato e quelli che mi hanno ostacolato, quelli che mi hanno voluto bene e, sì, anche quelli che non me ne hanno voluto.

E, infine, ma non meno importante, desidero dare un caro abbraccio a quei Viareggini che il 29/06/2009 hanno ingiustamente pagato con la propria vita le debolezze di un sistema che non fa altro che metterci sempre più in pericolo e distruggere i nostri sogni e le nostre speranze. Ai familiari e amici di coloro che non ci sono più e ai sopravvissuti alla tragedia dico di guardare sempre avanti, così come lo dico a me stesso, e di portare con sé il ricordo e l’energia che queste persone avevano in vita.

Un GRAZIE sincero a tutti e buona fortuna!

Alessandro

5. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Arnold S, B. Kadenbach (1997). "The subunit structure of cytochrome *c* oxidase from tuna heart and liver". *Eur J Biochem* **248**:99-103

Azzone G. F., F. Massari, T. Possan (1977). "The generation of the proton electrochemical potential in its role in energy transduction". *Mol Cell Biochem.* **17**:101-112

Beauvoit B, M Rigoulet (2001). "Regulation of cytochrome *c* oxidase by adenylic nucleotides. Is oxidative phosphorylation feedback regulated by its end-products?. *IUBMB Life* 52:143-152

Blum J. J. (1996). "Ciliate metabolism" in "Ciliates: cells as organisms" (K Haussman and P.C. Bradbury eds.). pp 179-195.

Brunori M., A. Giuffrè, E. D'Itri and P. Sarti (1997). "Internal electron transfer in Cu-Heme oxidase". *J Biol Chem* **272**:19870–19874.

Brunori M., A. Giuffrè, P. Sarti (2005) "Cytochrome *c* oxidase, ligands and electrons". *J Biol Chem* **99**:324–336.

Burke P.V., D.C. Raittet, L.A. Allen, E.A. Kellogg, R.O. Poyton (1997). "Effects on oxygen concentration on the expression of cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase genes in yeast". *J Biol Chem.* **272**:14705-14712

Collins K., M. A. Gorovsky (2005). "*Tetrahymena thermophila*". *Curr Biol* **15**:317-8.

Eells J. T., M. T. T. Wong-Riley, J. Verhoeve, M. Henry, E.V. Buchman, M.P. Kane, L.J. Gould, R. Das, M. Jett, B.D. Hodgson, D. Margolis, H.T. Whelan (2004). "Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near infrared light therapy". *Mitochondrion* 4(5-6):559-567

Eells J. T., M. M. Henry, P. Summerfelt, M. T. T. Wong-Riley, E. V. Buchmann, M. Kane, N. T. Whelan, and H. T. Whelan (2003). "Therapeutic photobiomodulation for methanol-induced retinal toxicity" *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**:3439–3444.

Gordon S.A., K. Surrey (1960). "Red and far-red action on oxidative phosphorylation". *Radiat. Res*, **12**:325–339

Giuffrè A. , P. Sarti, E. D'Itri, G. Buse, T. Soulimane, and M. Brunori (1996). "On the Mechanism of Inhibition of Cytochrome *c* Oxidase by Nitric Oxide". *J. Biol Chem*. **271**:33404–33408.

Giuffrè A., M. C. Barone, M. Brunori, E. D'Itri, B. Ludwig, F. Malatesta, H.-W. Müller, and P. Sarti (2002). "Nitric Oxide Reacts with the Single-electron Reduced Active Site of Cytochrome *c* Oxidase". *J. Biol Chem*. **277**:22402–22406.

Hebert P.D., S. Ratnasingham, R.J. DeWaard (2003). "Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species". *Proc Biol Sci* 270 Suppl 1:S96-99

Hill D.L. (1972). "The Biochemistry and Phisiology of *Tetrahymena*". Academic Press, New York

Karu T., (1999) "Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells", *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **49**, 1–17.

Karu T., L. V. Platibrat, G. S. Kalendo, N.G. Serebriakov (1993). "Changes in the amount of ATP in HeLa cells under the action of He-Ne laser radiation" *Biulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*. **115(6)**:617-618.

Karu T. I., L. V. Pyatibrat and G. S. Kalendo (2004). "Photobiological modulation of cell attachment *via* cytochrome c oxidase". *Photochem. Photobiol. Sci.*, **3**:211–216.

Kato M., K. Shinzawa, S. Yoshikawa (1981). "Cytochrome oxidase is a possible photoreceptor in mitochondria". *Photobiochem & Photobiophys*, **2**:263–269.

LaMarche A. E. P., Marina I. Abate, Samuel H. P. Chant, and Bernard L. Trumpower. (1992). "Isolation and characterization of COX12, the nuclear gene for a previously unrecognized subunit of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase". *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 31, 22473-22480.

Lloyd D, B. Chance, (1972). "The cytochromes of mitochondria from *Tetrahymena pyriformis* strain ST". *Biochem J.*, **128(5)**:1171-1182.

Mc Ewen J.E., M.G. Cumsky, C. Ko, S.D. Power, R.O. Poyton (1984). "Mitochondrial membrane biogenesis: characterization and use of Pet mutants to clone the nuclear gene coding for subunit V of yeast cytochrome c". *J.Bio.Chem*, **24**: 229-242.

Nicholls P. (1975). "Formate as an inhibitor of cytochrome c oxidase". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**: 610–616.

Nicholls P. (1976). "The effect of formate on cytochrome *aa*₃ and on electron transport in the intact respiratory chain". *BBA* **430**:13–29.

Ohlmeier S., A.J. Kastaniotis, J.K. Hiltunen, U Bergmann (2004). "The Yeast mitochondrial proteome, a study of fermentative and respiratory growth". *J.Biol.Chem.* **279**:3956-3979.

Orias et al. in Asai D. J. and J. D. Forney (2000). "*Tetrahymena thermophila*". Cap 4. Academy Press, New York.

Padan E., H. Rottenberg (1973). "Respiratory control and the proton electrochemical gradient in mitochondria". *Eur J Biochem.* **40**:431-437

Passarella S., E. Casamassima, S. Molinari, D. Pastore, E. Quagliariello, I.M. Catalano and A. Cingolani, (1984). "Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiation in vitro by helium-neon laser", *FEBS*, **175**, 95–99

Prescott D. (1994). "The DNA of ciliated protozoa". *Microbiol Review* **58**: 233–267.

Remedi A.. "Effetti dell'irraggiamento con luce visibile – vicino infrarosso sulla citocromo c ossidasi *in vitro* e *in vivo*". Tesi di Laurea, Università di Pisa, Anno Accademico 2004-2005.

Rieger T., J Napivotzky, F.J. Hunter, B. Kadenback (1995). "The number of nucleotide binding sites in cytochrome c oxidase". *Biochem Biophys Res. Commun.* **217**:34-40

Seme M. T., P. Summerfelt, J. Neitz, J. T. Eells, and M. M. Henry (2001). "Differential Recovery of Retinal Function after Mitochondrial Inhibition by Methanol Intoxication". *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **42**:834-841.

Schiestl. R.H., S. Igarashi, and P.J Hasting (1988). "Analysis of the mechanism for reversion of a disrupted gene". *Genetics*, **119**: 234-247.

Schiestl, R.H. (1989). "Non mutagenic mutagen-induced intrachromosomal recombination in yeast". *Nature*, **337**: 285-288

Sharpe M. A. and C. E. Cooper (1998). "Interaction of Peroxynitrite with Mitochondrial Cytochrome Oxidase. Catalytic Production Of Nitric Oxide And Irreversible Inhibition Of Enzyme Activity". *J. Biol. Chem.*, **273**:30961-30972.

Shrago E, C Elson (1980). "Intermediary metabolism of Tetrahymena". In *Biochemistry and Physiology of Protozoa - 2nd ed.*, **3**: 287-312, Eds. M Levandowsky and S. H. Hutner, Academic Press, New York.

Taanman J.W., P. Turina, R.A. Capaldi (1994). "Regulation of cytochrome c oxidase by interaction of ATP at two binding sites, one on subunit VIa". *Biochemistry* **33**:11833-11841

Vekshin N. L. (1991). "Light-dependent ATP synthesis in mitochondria". *Biochem. Int*, **25**: 603-611.

Vladimirov Y. A., A. N. Osipov, and G. I. Klebanov, (2004). "Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation", *Biochemistry (Moscow)*, **69**, 81-90.

Voet D., Voet J.G. (1990). "Trasporto degli elettroni e fosforilazione ossidativa", In *Biochimica*, **cap 20**, Ed. Zanichelli, Bologna.

Whelan H. T., E. Buchmann, A. Dhokalia, M. P. Kane, N. T. Whelan, M. T. T. Wong-Riley, J. T. Eells, L. J. Gould, R. Hammamieh, R. Das, M. M. Henry, and M. Jett. (2003). "Effect of NASA Light-Emitting Diode Irradiation on Molecular Changes for Wound Healing in Diabetic Mice". *J. Clin. Las. Med. Surg.*, **21**:67-74,.

Wilson K., J. Walker (1995). “L’elettrodo ad ossigeno di Clark”, In *Metodologia biochimica*, **11.6** pp. 572-579. Raffaello Cortina Editore.

Wong-Riley M. T. T., H. L. Liang, J. T. Eells, B. Chance, M. M. Henry, E. Buchmann, M. Kane, and H. T. Whelan (2005). “Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: Role of cytochrome c oxidase”. *J Biol Chem*. **280**:4761-4767.

Wong-Riley M. T., X Bai, E Buchmann, H.T. Whelan. (2001) “ Light-emitting diode treatment reverses the effect of TTX on cytochrome oxidase in neurons” *Neuroreport*, **12(14)**:3033-3037

Waterland R.A., A. Bassu, B. Chance, R.O. Poyton (1991). “The isoforms of yeast cytochrome *c* oxidase subunit V alter the in vivo kinetic properties of the holoenzyme”. *J Biol Chem* **266**:4180-4186.